

Day 3 – Technical Programme

3A2 - Tissue Engineering (II) & Biosignal Processing (IV)

Date: Friday, 9 Dec 2005

Time: 1320 - 1530

Venue: Meeting Rm 202

3A2-02

Availability of Ultra-High Pressure Method for the Preparation of Decellularized Tracheal Grafts

M. Suga, T. Fujisato and T. Nakatani

Decellularized tracheal grafts are expected to be applied for the treatment of extensive tracheal defects. Here, we tried to elucidate the availability of ultra-high pressure method for the cell-exclusion of tracheal grafts. B-N rat tracheae were decellularized by cryopreservation (CR), Triton X-100 (TX) or ultra-high pressure (980 MPa for 10 min at 4 °C, UHP). Fresh (FR) or treated each trachea was transplanted in the subcutaneous space of the Lewis rat. Decellularized porcine tracheae by CR, TX or UHP were served for the pathological study, compression test or PCR assay for porcine endogenous retrovirus (PERV) DNA. Although FR and CR tracheae remained cells in the entire area, cellular contents in TX and UHP tracheae were almost excluded except in deep cartilage. Severe wall thickness with marked cell infiltration was observed in rat FR tracheae 4 weeks after allo-transplantation, whereas rat CR, TX and UHP tracheae showed minimum allo-rejection. Structural strength of porcine TX tracheae declined by about 60 % compared with those of porcine CR or UHP tracheae. PERV-DNA was detected in porcine CR and TX tracheae but not in UHP tracheae. UHP seems to be a promising method for the preparation of allogeneic or xenogeneic decellularized tracheal grafts.

AVAILABILITY OF ULTRA-HIGH PRESSURE METHOD FOR THE PREPARATION OF DECELLULARIZED TRACHEAL GRAFTS

Michiharu Suga, MD, PhD^{*,**}, Toshiya Fujisato, PhD^{*} and Takeshi Nakatani, MD, PhD^{**}

^{*}Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering
National Cardiovascular Center Research Institute

^{**}Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center Hospital
National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan

msuga@ri.nccvc.go.jp

Abstract: Decellularized tracheal grafts are expected to be applied for the treatment of extensive tracheal defects. Here, we tried to elucidate the availability of ultra-high pressure method for the cell-exclusion of tracheal grafts. B-N rat tracheae were decellularized by cryopreservation (CR), Triton X-100 (TX) or ultra-high pressure (980 MPa for 10 min at 4 °C, UHP). Fresh (FR) or treated each trachea was transplanted in the subcutaneous space of the Lewis rat. Decellularized porcine tracheae by CR, TX or UHP were served for the pathological study, compression test or PCR assay for porcine endogenous retrovirus (PERV) DNA. Although FR and CR tracheae remained cells in the entire area, cellular contents in TX and UHP tracheae were almost excluded except in deep cartilage. Severe wall thickness with marked cell infiltration was observed in rat FR tracheae 4 weeks after allo-transplantation, whereas rat CR, TX and UHP tracheae showed minimum allo-rejection. Structural strength of porcine TX tracheae declined by about 60 % compared with those of porcine CR or UHP tracheae. PERV-DNA was detected in porcine CR and TX tracheae but not in UHP tracheae. UHP seems to be a promising method for the preparation of allogeneic or xenogeneic decellularized tracheal grafts.

Introduction

It is well known that decellularization highly reduces immunogenicity of allogeneic or xenogeneic graft tissues because almost all of the major histocompatibility antigens are existed on the surface of donor cells.

There are plenty of studies that demonstrated the graftability of acellular foreign bio-tissues without any immunosuppressive therapies [1, 2, 3], and Clinical usefulness of allogeneic or xenogeneic decellularized graft tissues has also been reported recently [4, 5, 6]. Several modalities have been considered for cell removal or destruction from animal tissues, such as rapid freeze-and-thaw, detergents and proteases. However, practical use of these methods are limited due to incomplete decellularization, existence of survived microorganisms including virus, change in mechanical

characteristics, toxicity of additives used or cost for storage and transportation.

This study was designed to elucidate the availability of ultra-high pressure method for the preparation of decellularized tracheal grafts.

Materials and Methods

Animals: Male Brown-Norway (B-N) and Lewis rats, and CLAWN miniature pigs were used. All animal care was based on guidelines published in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 85-23, revised 1985). The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan.

Ultra-high pressure method: Tracheal segments served for ultra-high pressure method were placed in a chamber, which was filled with phosphate buffered saline (PBS)-based solution, of an ultra-high pressure apparatus with thermo control unit (Dr. Chef, Kobe Steel Ltd., Hyogo, Japan). The chamber was subjected to the pressure of 980 MPa for 10 min and maintained at 4 °C during the processing.

Experimental design: Exp 1 (rodent study): Tracheal 5-ring-segments of B-N rats were divided into 4 groups by the type of treatments as follows. CR: decellularization by immersion in liquid nitrogen, followed by cryopreservation C for 4 weeks at -80°, TX: decellularization by immersion in for 1 % Triton X-100 solution for 24 hr and subsequent rinsing with PBS for 2weeks, followed by storage in PBS for 2 weeks at 4 °C, UHP: decellularization by the ultra-high pressure method and subsequent rinsing with PBS for 2weeks, followed by storage in PBS for 2 weeks at 4 °C, FR: no treatment (fresh trachea). Each trachea was implanted in the subcutaneous space of the Lewis rat and extracted 4 weeks later. Exp 2 (porcine study): Tracheae of CLAWN miniature pigs were cut into 1cm segments. Each Sample was decellularized and preserved by CR, TX or UHP.

Pathological study: Tracheal samples were fixed with 10% formalin, embedded in paraffin, cut into 5 µm section and stained with hematoxylin and eosin for pathological examination.

Compression test of the tracheae: Structural strength of porcine tracheal segments was analyzed using a universal testing machine (TENSILON RTC-1150A, Orientec Corporation, Tokyo, Japan). After the placement and height adjustment of each tracheal sample, contraction stress was determined when the width was shortened by 5 mm.

Measurement of porcine endogenous retrovirus-DNA: The expression of porcine endogenous retrovirus (PERV)-DNA in porcine tracheal samples was measured by polymerase chain reaction assay. Briefly, template DNA purified from each tracheal tissue was amplified using specific primer pairs of F : 5'-GCTACAACCA'TTAGGAAAAC'TAAAAAG-3' and R : 5'-AACCAGGACTGTATATCTTGA'ICAG-3'. The products were blotted onto nylon membrane after electrophoresis on an agarose gel.

Statistical analysis: All data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Comparison among groups was carried out using analysis of variance (ANOVA). When ANOVA showed a significant difference among the groups, Fisher PLSD post-hoc test was utilized to determine which group difference accounted for the significant p value. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Pathology of decellularized tracheae: In both rodent and porcine studies, cellular contents in TX and UHP tracheae were almost excluded except in deep region of cartilage, whereas FR and CR tracheae remained cells in their entire area.

Pathology of transplanted rat tracheae: Severe wall thickness and fibrous airway obliteration with marked cell infiltration was observed in rat FR tracheae 4 weeks after allo-transplantation. On the other hand, rat CR, TX and UHP tracheae showed very slight allo-rejection. In addition, TX tracheae became collapsed until the lumen disappeared.

Structural strength of porcine tracheae: Mean contraction stress of porcine TX tracheae declined by about 60 % compared with those of porcine CR or UHP tracheae (CR: 592 ± 124 gf, TX: 343 ± 83 gf, UHP: 606 ± 110 gf; TX vs. CR or UHP: $p < 0.05$).

PERV-DNA in porcine tracheae: The DNA band of PERV was undetectable in porcine UHP tracheae, while those in porcine TX and CR tracheae were sharply confirmed.

Discussion

In the current study, we clearly demonstrated that ultra-high pressure method is able to exclude most of cells, maintain structural strength and diminish PERV-DNA of rodent and/or porcine tracheae.

Freeze-and-thaw is one of the most simple and popular methods for cell destruction of bio-tissues. Most of cell components, however, still remained in the tissues at the time of transplantation. Furthermore, pathogenic bacteria and virus possibly exist as well. Another issue of this treatment is a cost for storage and

transportation because deep freezers are necessary to carry out.

Triton X-100 is also widely used to remove cells from a variety of animal tissues. Our observations that rodent TX tracheae could not maintain the lumen and porcine TX tracheae showed significantly reduced contraction stress compared to CR and UHP tracheae indicate that the mechanical strength of tracheae weaken when triton X-100 is utilized for cell exclusion. Also, the toxicity of triton X-100 must be considered. Fujisato et al. have recently reported that triton X-100 still remains in porcine heart valves after the treatment with this chemical and subsequent rinsing for 2 weeks [7].

The risk of PERV infection is an always brought subject when pig-to-human xenotransplantation is discussed. In this study, only porcine UHP tracheae showed undetectable range of PERV-DNA among three treatment groups. In addition, UHP inactivate prion infectivity in processed meat in the literature [8].

Further investigation will be needed to elucidate the feasibility of clinical allogeneic or xenogeneic tracheal transplantation with this method.

Conclusions

Ultra-high pressure method seems to be a promising option for the preparation of allogeneic or xenogeneic decellularized tracheal grafts in terms of cell removal, maintenance of structural strength and sterilization including PERV.

References

- [1] INUTSUKA K., KAWAHARA K., TAKACHI T., OKABAYASHI K., SHIRAIISHI T., SHIRAKUSA T. (1996): 'Reconstruction of trachea and carina with immediate or cryopreserved allografts in dogs'. *Ann. Thorac. Surg.*, **62**, pp. 1480-4
- [2] LIU Y., NAKAMURA T., YAMAMOTO Y., MATSUMOTO K., SEKINE T., UEDA H., SHIMIZU Y. (2000): 'Immunosuppressant-free allotransplantation of the trachea: The antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment'. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **120**, pp. 108-14
- [3] MURAKAWA T., NAKAJIMA J., MOTOMURA N., MURAKAMI A., TAKAMOTO S. (2002): 'Successful allotransplantation of cryopreserved tracheal grafts with preservation of the pars membranacea in nonhuman primates'. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **123**, pp. 153-60
- [4] LAUB W., MURALIDHARAN S., CLANCY R., ELDREDGE J., CHEN C., ADKINS S., FERNANDEZ J., ANDERSON A., MCGRATH B. (1992): 'Cryopreserved allograft veins as alternative coronary artery bypass conduits: early phase results'. *Ann. Thorac. Surg.*, **54**, pp. 826-31
- [5] KIRKLIN K., SMITH D., NOVICK W., NAFTEL C., KIRKLIN W., PACIFICO D., NANDA C., HELMCKE R., BOURGIE C. (1993): 'Long-term function of cryopreserved aortic homografts. A ten-year study'. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **106**, pp. 154-65

- [6] BECHTEL F., MÜLLER-STEINHARDT M., SCHMIDTKE C., BRUNSWIK A., STIERLE U., SIEVERS H. (2003): 'Evaluation of the decellularized pulmonary valve homografts (SynerGraft)'. *J. Heart. Valve. Dis.*, 12, pp. 734-9
- [7] FUJISATO T., KITAMURA S. (2003): 'Custom-made heart valve using biological tissue scaffold'. *Junkankihyo-no-shinpo*, 43, pp. 65-71
- [8] BROWN P., MEYER R., CARDONE F., POCCHARI M. (2003): 'Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: A practical method to prevent human infection'. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, pp. 6093-7

3A2-07

PowerGraft: A virus-free acellular scaffold by detergent-free treatment

T. Fujisato, K. Minatoya, K. Niwaya, A. Kishida, S. Hashimoto, T. Nakatani and S. Kitamura

Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogeneic matrices have been widely studied to have more durability and functionality with growth potential and less immunogenicity. Whereas they have still several problems to be solved such as degradation control of biodegradable polymeric scaffolds and transfer of unknown animal related infectious diseases. In this paper, our novel tissue processing for decellularization named PowerGraft using ultrahigh pressure for the safe tissue transplantation was reported. Porcine cardiac and vascular tissues were isolated and treated by a cold isostatic pressing at 4°C for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out in PBS-based washing solution under microwave irradiation 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 aortas and pulmonary valves were transplanted to allogeneic miniature pigs. The explanted grafts showed well cell infiltration and endothelialization. This PowerGraft processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue transplantation.

PowerGraft: A virus-free acellular scaffold by detergent-free treatment

T Fujisato*, K Minatoya*, K Niwaya*, A Kishida**, S Hashimoto***,
T Nakatani* and S Kitamura*

* National Cardiovascular Center, Suita, Japan

** Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

*** Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

fujisato@ri.ncvc.go.jp

Abstract: Tissue engineered grafts based on polymeric or acellular xenogenic matrices have been widely studied to have more durability and functionality with growth potential and less immunogenicity. Whereas they have still several problems to be solved such as degradation control of biodegradable polymeric scaffolds and transfer of unknown animal related infectious diseases. In this paper, our novel tissue processing for decellularization named PowerGraft using ultrahigh pressure for the safe tissue transplantation was reported. Porcine cardiac and vascular tissues were isolated and treated by a cold isostatic pressing at 4°C for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out in PBS-based washing solution under microwave irradiation 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 aortas and pulmonary valves were transplanted to allogeneic miniature pigs. The explanted grafts showed well cell infiltration and endothelialization. This PowerGraft processing may provide more durable and safe bioscaffold for the tissue transplantation.

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 heart 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 valves is relatively short in about 15 to 20 years in elderly and 5 to 10 years in paediatric patients by the calcification of the glutaraldehyde-fixed animal tissues. Recently, the cryopreserved homograft (allograft) valves have been clinically applied thanks to the establishment of a tissue banking system worldwide. However, since they are donated from the cadavers, the supply is very limited. In addition to the above issues, all the grafts lack the

growth potential and they may be replaced through the patients' growth process.

The reconstruction of heart valves using polymeric or acellular xenogenic scaffolds has been studied to have more durability with growth potential which applicable to paediatric patients. 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. Most of the groups developing acellular scaffolds have been using detergents and/or enzymes as decellularization media such as Triton[®] X-100, sodium dodecyl sulfate, deoxy-cholate, trypsin, DNase, and RNase. Since the detergents are generally cytotoxic and it takes time for their removal before the transplantation, 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. We have been developing a novel tissue processing for preparation of acellular grafts by ultrahigh pressure treatment named PowerGraft for the safe valvular and aortic tissue transplantation. This process does not include any detergent and may be applicable to large tissues.

Materials and Methods

The porcine tissues of heart valves and aortas 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 decellularized by our PowerGraft technology. Briefly, the tissues were packed in sterile bags filled with PBS. The packed tissues were treated by ultrahigh pressure of 980 MPa at 4 °C using a cold isostatic pressing (CIP) apparatus (Fig. 1; Kobe steel LTD, Kobe, Japan) for cell demolition. They were then rinsed by PBS-based washing solution under microwave irradiation at 4 °C (Fig. 2; Azumaya Medical Devices Inc., Tokyo, Japan) for removal of the residues of the broken cells. 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.

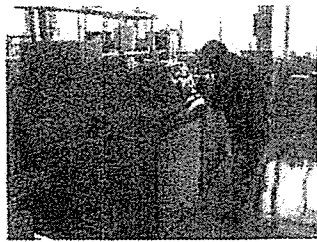


Figure 1: CIP apparatus for PowerGraft.

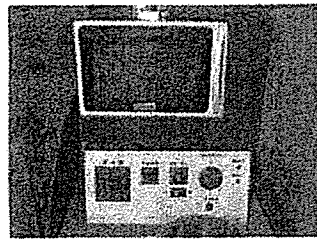


Figure 2: Microwave apparatus for PowerGraft.

The acellular scaffolds were transplanted into the allogeneic miniature pigs. The aortas were transplanted at descending aorta through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. The pulmonary valves were transplanted at right ventricular outflow tract through a median sternotomy with extracorporeal circulation without blood oxygenation¹⁾. In both cases, postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 4, 12, and 24 weeks 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).

Results

The tissues were completely cell free when the CIP of 970 MPa was applied for 10 min and washed under the microwave irradiation for 5 days from the H-E staining (Fig. 3). There was no PERV products detected in PCR assay from the tissues applied by the CIP whereas still detected in the tissue treated by Triton[®] X-100 of 24 hr incubation. The tissues pre-contaminated by the normal bacteria floras were decontaminated when treated at more than 485 MPa. 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 of the leaflets treated at 970 MPa for 10 min (Fig. 4).

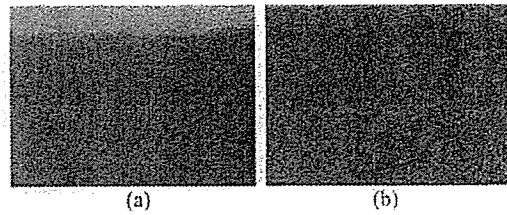


Figure 3: Decellularization of porcine aorta. (a: native b: PowerGraft)

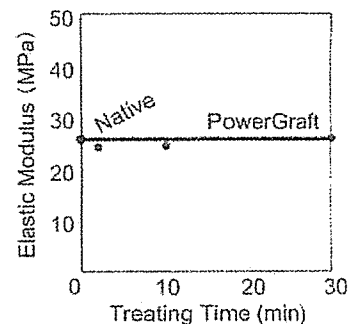


Figure 4: Elastic modulus of decellularized leaflet of porcine pulmonary valves by PowerGraft technology of 970 MPa.

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. 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 after 12 weeks. It was dominant in the latter. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells after 24 weeks, mainly by smooth muscle cells (Fig. 5). There was no inflammation and calcification observed in the tissue. In the descending aorta study, the endothelium and cell infiltration was same as the pulmonary valve study after 12 weeks, however intimal proliferation was notable and calcification was observed along to elastic fibrils in a middle area of the acellular graft after 24 weeks (Fig. 5).

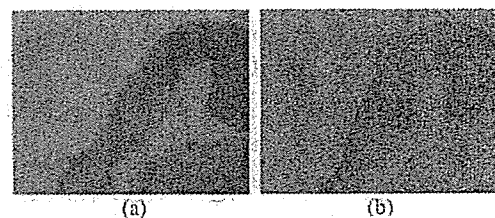


Figure 5: Explanted acellular pulmonary valve 24 weeks after the transplantation. (a: H-E, b: anti-aSMA staining)

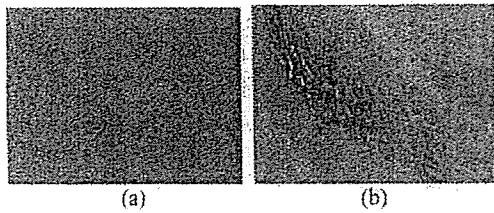


Figure 5: Explanted acellular grafts 24 weeks after the transplantation in von-Kossa staining. (a: pulmonary valve, b: aorta)

Discussion

Most of the groups have been using detergents and/or enzymes for decellularization. Since the decellularization depends on the permeation of the agent through the tissue, it may not be applicable to large and hard tissues like cartilage. The PowerGraft technology utilizes the CIP that presses throughout the tissue by Pascal's principle. We have already found that this technology could be successfully applied to cartilage tissues for decellularization. More effectively, it has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP more than 600 MPa². This means the treatment is able to sterilize the tissue in addition to the decellularization. The effect of the microwave irradiation is the same as the appliance of conventional microwave oven using the vibration of water molecules at 2,450 MHz. The principle of acceleration of the washing time by microwave irradiation is still unclear but supposed that it courses high-speed motion of water molecules and enhancement of the permeation in the tissues. It is not necessary to use the microwave for washing after the CIP treatment, however it make washing time about one tenth compared to the conventional incubation.

We have chosen the Clawn miniature pig 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. The explanted grafts showed host cell infiltration especially in the pulmonary valves. Whereas there is still a problem of calcification in the aorta study and currently we are investigating its mechanism. Recently, Prof. Konertz and his group in Germany have reported excellent clinical results of acellular porcine pulmonary heart valves³. We are planing a clinical application of the acellular grafts in the near future.

Conclusions

There have been developed a lot of medical devices whereas still required of innovation in many areas and it is unable to give growth activity to the current artificial devices. Our novel decellularization method of PowerGraft was developed to have a safe bioscaffold by ultrahigh pressure treatment of the CIP and washing under the microwave irradiation. Porcine cells and

PERV were removed completely from the animal tissues in a short period without changing the biomechanical property. These findings suggest the tissues applied by the CIP could be used as the safe bioscaffold even based on the xenogenic tissues that have risks of unknown animal related diseases.

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.

References

- [1] NUMATA S., FUJISATO T., NIWAYA K., ISHIBASHI-UEDA H., NAKATANI T., KITAMURA S. (2004): 'Immunological and Histological Evaluation of Decellularized Allograft in a Pig Model: Comparison with Cryopreserved Allograft', *J. Heart Valve Dis.*, **13**, pp. 984-90
- [2] HAYASHI R. (2002): 'High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value', *Biochem Biophys Acta*, **1595**, pp. 397-9
- [3] KONERTZ W., DOHMEN P., BEHOLZ S., LIU J., DUSHE S., ERDBRUGGER W. (2004): 'Are decellularized xenogenic heart valves ready for clinical use?', *Proc. Advances in Tissue Engineering and Biology of Heart Valves*, Florence, Italy, 2004, p. 37

1A1-C3 構造タンパクの酵素処理によるバイオスキャフォールド調製 Enzymatic Processing of Structural Proteins for Bio-Scaffold Preparation

○寺田堂彦*, 澤田和也**, 言田謙一***, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫****, 永谷憲歳, 中谷武嗣, 北村惣一郎
*医療機器センター, **大阪成蹊短大, ***先端医療振興財団, ****東京医科歯科大, 国立循環器病センター
○Dohiko Terada*, Kazuya Sawada**, Kenichi Yoshida***, Seiichi Funamoto, Toshiya Fujisato,
Akio Kishida****, Noritoshi Nagaya, Takeshi Nakatani, Soichiro Kitamura.
*JAAME, **Osaka Seikei College, ***FBRI, ****Tokyo Med. Dent. Univ., NCVC.

1. 緒言

我々では、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 (株式会社ジャパンファーム) を、エラスターゼ (エラスチン分解酵素, 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 (図1)。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 (図2)。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。



Fig. 1 Elastic van Gieson stain of the porcine aorta that was processed as followed. The tissue was partially fixed in 1 wt% glutaraldehyde(GA) solution for 1 h at room temperature and then subjected to elastase digestion for 4 days at 37 °C. The bar is corresponding to 200 μm.

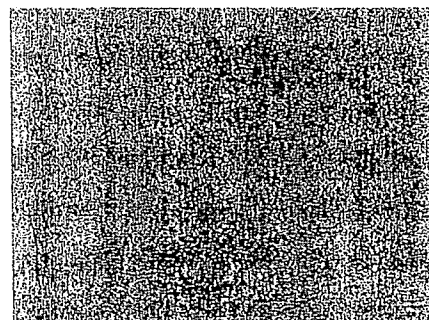


Fig. 2 Hematoxylin and eosin stain of the processed aorta. First, partial fixation was performed in 0.1 wt% GA solution for 1 h at room temperature. Then the tissue was treated in elastase solution to degrade elastic fibers for 4 days at 37 °C. The bar is corresponding to 200 μm.

1A1-C4 脱細胞化生体組織（バイオスキャフォールド）の再細胞化

Re-cellularization of Acellularized Biological Tissue

○岸田晶夫、藤里俊哉*、船本誠一*、西岡 宏*、吉田謙一*、湊谷謙司*、庭谷和夫*、村越彩子、
木村 剛、中谷武嗣*、北村惣一郎*

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

*国立循環器病センター

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

National Cardiovascular Center Research Institute

我々は、生体組織からドナー由来の細胞成分を除去した生体スキャフォールドを用いた再生医療について研究を行っている。これまでに、脱細胞化組織を移植した場合と、レシピエントの自己細胞を播種したテーラーメイド型組織移植を行った場合のそれぞれについて検討を行ってきた。前者については、緊急時の対応、輸送・保存時の安定性、広範な応用に対応し、後者については、レシピエント細胞を組み込むことで、小児患者に適用可能な自己修復性や成長性を有する移植組織が創製できると期待できる。いずれの場合においても、脱細胞化組織内部への細胞の侵入と組織再構築の過程が必要であり、それぞれの応用については、未解決の部分が多い。本講演では、脱細胞化組織の再細胞化の観点から、我々の研究について紹介する。

清潔下にてミニブタ大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理にてドナー由来細胞を除去した。これを、そのままミニブタに同種移植を行う場合と、レシピエントとなるミニブタから採取した血管内皮細胞、血管壁細胞等を増殖した後、これをスキャフォールドに種々の方法で播種し、*in vitro* で再細胞化した後にミニブタに移植する場合の2例について検討を行った。

脱細胞化スキャフォールドをそのまま移植した場合、移植1~6ヶ月において良好な開存性を示した。組織切片観察より、血管内腔面と外面から細胞が徐々に浸潤してくる様子が観察された。免疫染色の結果、血管内腔面はすみやかに血管内皮細胞様細胞に覆われることが明らかとなった。血管壁部分は、平滑筋細胞様細胞と繊維芽細胞の混合した細胞集団が存在し、6ヶ月後においても大きな変化は見られなかった。炎症性細胞については、3ヶ月までに消失していた。これにより、脱細胞化組織そのままでも、高い組織適合性を有し、組

織再生が可能であることが示唆されたと考えている。しかし、血管壁部分の再構築に時間がかかること、および繊維芽細胞の混合が見られることから長期の観察が必要である。

一方、*in vitro* で再細胞化するには、細胞の播種法にいくつかの手法を用いた。単純に基材上に設置した組織に細胞分散液を播種しても、組織への細胞の接着はほとんど起こらない。そのため、汎用ディスペンサ装置にてスキャフォールド組織内に細胞を注入播種する方法、および回転及び循環培養装置を用いて組織表面に細胞を播種する方法を考案し、比較検討した。

脱細胞化心臓弁及び血管スキャフォールド組織内に、汎用ディスペンサ装置を用いて細胞を注入することができた。しかし、均一性および定量性の向上のために装置の改良が必要であることが示唆された。また、回転及び循環培養装置によってレシピエントの内皮細胞を均一に播種することができた。接着と培養液の循環条件を精緻に制御する必要があり、こちらについても装置の改良によって、より確実に、簡便に播種できることが期待される。さらに、心臓弁及び血管について、ミニブタによる動物実験において有効性を検討した。細胞播種された組織においては、血流にさらされても脱落することなく存在していた。*In vitro* 再細胞化の有効性については、現在、長期埋入実験により、経過観察中である。

脱細胞化組織の再細胞化については、*insitu* および *in vitro* で可能であった。長期観察により、差異について検討する予定である。

本研究は、厚生労働科学研究費補助金、科学技術振興調整費、日本学術振興会科学研究費補助金、ヒューマンサイエンス総合研究事業によって行われた。

第33回生活支援工学系学会連合大会（2005年12月、三重）

218 超臨界技術を利用した再生医療用スキャフォールド調製
Application of Supercritical Fluid techniques to The Processing for Regenerative Tissue Scaffold

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

Dohiko TERADA, JAAME, 3-42-6 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo
 Kazuya SAWADA, Osaka Seikei College, 3-10-62 Aikawa, Higashiyodogawa-ku, Osaka
 Ken'ichi YOSHIDA, FBRI, 2-2 Minatojimaminami-tyo, Chuo-ku, Kobe, Hyogo
 Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo
 Seiichi FUNAMOTO, Toshia FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, and
 Soichiro KITAMURA,
 National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita-shi, Osaka

1. はじめに

我が国では、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、3割で使用されるブタ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。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、細胞成分を洗浄除去する方法である。しかしながら、細胞毒性を有する界面活性剤の残存や、細胞成分の完全除去については未だ多くの問題点が残されている。

そこで本研究では、従来の脱細胞化手法に代わる新たな手段として、超臨界流体抽出法の適応を検討した。本手法では、二酸化炭素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、二酸化炭素系へエントレーナを共存させ、処理条件を変化させた場合の脱細胞化効果、および生体組織の力学特性への影響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。

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おいて、圧力、温度および処理時間を変化させて行った。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。

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⁾に準じて化学分析により行った。

力学特性は、動脈の円周方向についての引張試験を行い評価した。ただし、試料は超臨界流体処理によって脱水されるため、処理後、生理食塩水に浸漬し、4℃で2日間以上吸水させた後に引張試験を行なった。

3. 結果と考察

図1に、処理温度および処理時間一定の条件下において、処理圧力を変化させて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た。図から明らかなように、

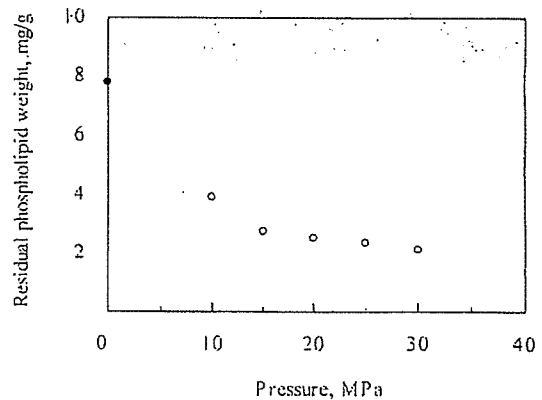


Fig. 1 The dependence of residual phospholipid weight on the supercritical fluid pressure in extraction process (the treatment time and the temperature are constant, 60 min and 37℃, respectively). The solid circle means the control value.

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、十分に溶媒和され溶解除去されることがわかる。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ことも確認された。

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(図2)。細胞膜成分の溶解によって、DNAなどの細胞成分も物理的に組織外部へ拡散したためと考えられる。これは、リン脂質の組織内含有量の低下とも矛盾せず、本手法によって生体組織内部からドナー由来細胞を除去することが可能であることを示唆する結果であるが、残存DNAはたとえ微量であっても免疫反応を引き起こすため、今後、残存DNA量を定量的評価する必要がある。

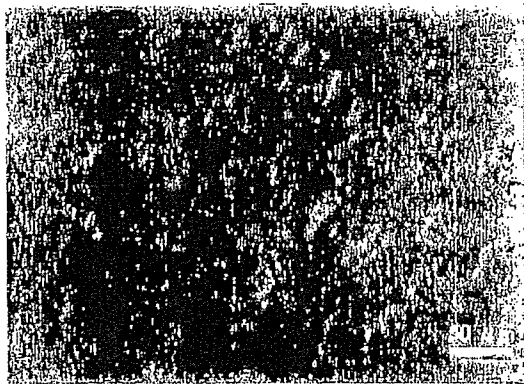


Fig.2 Hematoxylin and eosin stain of the aorta treated in the supercritical fluid. The treatment conditions are 37 °C, 25 MPa and 60 min.

図3に、処理温度および処理時間一定の条件下において、圧力を変化させて超臨界二酸化炭素処理を行なった際の重量残留率と、その後の吸水処理による重量回復後の重量残留率を示した。超臨界流体処理によって試料は脱水されるため、処理後の重量残留率は70~80%であったが、処理圧力に関わらず吸水処理後の重量は初期重量に対して85%程度までには回復しなかった。これは、タンパクの変性によって水和出来る部位が減少したためと考えられる。

図4に、処理温度および処理時間一定の条件下において、圧力を変化させて超臨界二酸化炭素処理を行なった際の、応力-歪み曲線の変化を示した。超臨界流体処理によって引張

強さは増大した。超臨界流体雰囲気ではコラーゲンなどの構造タンパクに変性が生じたためと考えられる。

本発表では、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も報告する。

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

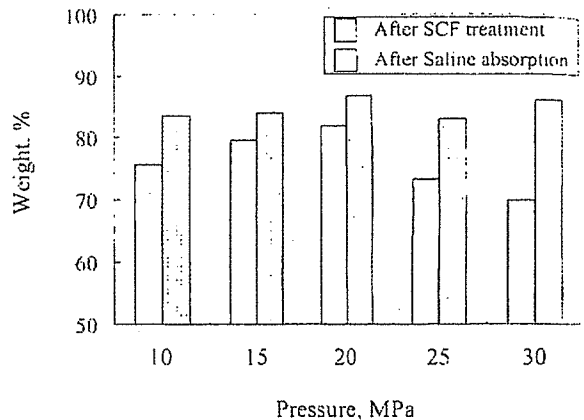


Fig.3 The residual weight after SCF treatment and recovered weight after saline absorption. SCF treatment temperature and time are 37 °C and 60 min respectively.

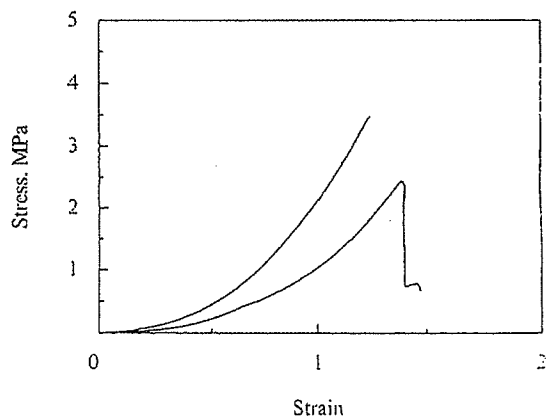


Fig.4 Stress-Strain curves of control and SCF treated samples. SCF treatment condition is 37 °C, 30 MPa and 60 min.

219 脱細胞組織のエタノール処理による力学特性への影響

Influence to the mechanical properties of the decellularized tissues
by ethanol treatment

- 江橋 具 (国立循環器病センター) 船本 誠一 (国立循環器病センター)
吉田 謙一 (先端医療振興財団) 正 岸田 晶夫 (東京医科歯科大学)
永谷 憲歳 (国立循環器病センター) 中谷 武嗣 (国立循環器病センター)
藤里 俊哉 (国立循環器病センター)

Tomo EHASHI, Seiichi FUNAMOTO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI,
Toshia FUJISATO, National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka
Ken'ichi YOSHIDA, The Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe
Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University

【緒言】

国内の心疾患による死亡者数は、悪性新生物について第2位と非常に高い死因のひとつとなっている。重篤な心疾患の治療法には、心臓や組織の移植による置換型治療が有効であるものの、我が国で臓器移植法が施行されてから心臓移植はわずか数十例であるとともに、組織移植に関してもドナー不足という問題が残っている。

近年、心筋梗塞などの再生医療型治療として、心筋の損傷部位に、患者から抽出した骨髄細胞や骨格筋の前駆細胞である筋芽細胞を、直接注入移植することにより心機能が回復したとの報告がなされた¹⁾。しかし、この方法は、細胞の生着率が低かったり、細胞同士のコミュニケーションが発達しないため、効率が悪いことが問題となっている。一方、筋芽細胞をディッシュ上で単層培養したのち非酵素作用により剥離した、筋芽細胞シートを心臓に移植する研究も行われ、注入による細胞移植よりも良好な結果が得られたことも報告されている²⁾。この場合、より組織に近い細胞を移植するために、細胞シートを積層する方法も行われているが、厚みを増すと内部の細胞への酸素などの供給が低下するため、厚さが100 μmと薄いものに限られてくる。したがって、より大きな患部を治療できる移植片を構築することは困難であると言える。

本研究では、厚みのある再生医療型筋移植片として、細胞の足場となる生体組織由来のスキヤフォールドを複製することを目的に、超高静水圧印加処理を用いる筋組織の脱細胞処理を行った。生体組織由来のスキヤフォールドを動物移植した場合に細胞膜成分であるリン脂質が残留していると、移植片の石灰化が誘発されるといわれていることから、脱細胞処理の過程でリン脂質を減少させるためにエタノールを使用し、処理のタイミングなどが組織の力学特性に及ぼす影響を調べた。

【方法】

食川ブタ心臓の心室筋を厚さ1.6 mmの板状にスライスし、超高静水圧印加処理を行い、組織内の細胞を破壊した。このときの処理条件は、10,000 atmの圧力を10分間、10℃の温度で行った。組織に残った細胞成分を除去するために洗浄を行ったのちHE染色を行い、組織学的に脱細胞されているかを観察した。さらに引張り試験を行って、作製したスキヤフォールドの力学特性を未処理の生体組織と比較した。

実験1 超高静水圧印加処理時に組織を浸漬する溶媒による力学特性への影響を調べた。組織を浸漬する溶媒は、通常のPBS(-)と、エタノール(50%、60%、70%、80%)を使用し、コントロールとしての未処理の心筋と比較した。

実験2 超高静水圧印加処理時は、通常通り組織をPBS(-)に浸漬して行い、その後の洗浄工程でエタノールを用いた。リン脂質は70%以上のエタノールで除去されるといわれていることから、80%エタノールを用いたものと、高濃度エタノールによる急激な脱水が影響するかどうかを確認するため、50%から80%まで10%ずつ濃度を上昇させる洗浄を行った。また、エタノール洗浄を行わないものと、未処理の心筋を比較として用いた。

【結果と考察】

脱細胞処理した組織のHE染色では、いずれの処理条件においても組織内の細胞核は染色されず、細胞は残留していないことが確認された。また、組織内の空隙率も比較的高いことがわかった。一例として、Fig. 1に超高静水圧処理時に溶媒としてPBS(-)を用い、洗浄工程で80%エタノールを使用した組織の観察結果を示した。

引張り試験を行った結果、超高圧印加時にエタノールを用いた場合には(実験1)、施圧直後の破断荷重はコン

コントロールや PBS (-) を用いた場合の 2 倍以上に上昇したが、洗浄処理後はいずれもほぼ同等の値であった。施圧直後の弾性率は、施圧時にエタノールを用いた場合にコントロールや PBS を用いたものより 4 倍以上高かったにもかかわらず (Fig. 2)、洗浄処理後は、施圧時に 80% エタノールを用いたものが、コントロールとほぼ同等の値を示した (Fig. 3)。

施圧後の組織洗浄におけるエタノール処理条件による弾性率への影響については (実験 2)、エタノール処理の有無にかかわらず、施圧直後の弾性率よりも 3 倍以上高い値を示し、未処理の組織よりも上昇していることがわかった。

これらの結果から、作製したスキャフォールドは未処理の組織よりも弾性率が上昇する傾向が見られたものの、高い空隙率を保持していることや生体内での引張りにも耐えうる十分な強度を維持していることから、再生型筋組織を構築するための細胞の足場として利用できる可能性が示唆された。今後、これらのスキャフォールドを用いて実際にいくつかの種類の細胞を三次元培養し、生体外での筋組織の構築を目指す予定である。

【謝辞】

本研究の一部は、厚生労働科学研究費、科学技術振興調整費及び知的クラスター創成事業の補助を受けて行われた。

【文献】

- 1) Menasche P. Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2(1): 21-28.
- 2) Momon IA et al. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 130(3): 646-653.

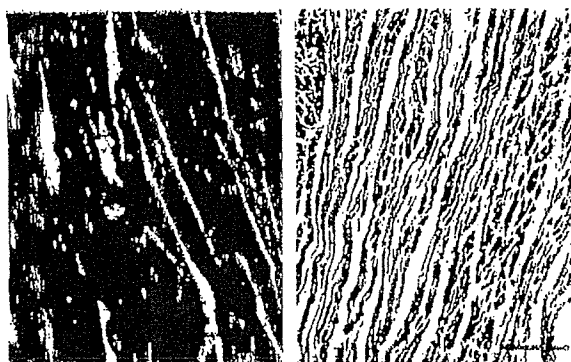


Figure 1. HE staining of the cardiac muscle (a) before and (b) after the decellularization treatment by ultrahigh pressure. Bars: 200 μ m.

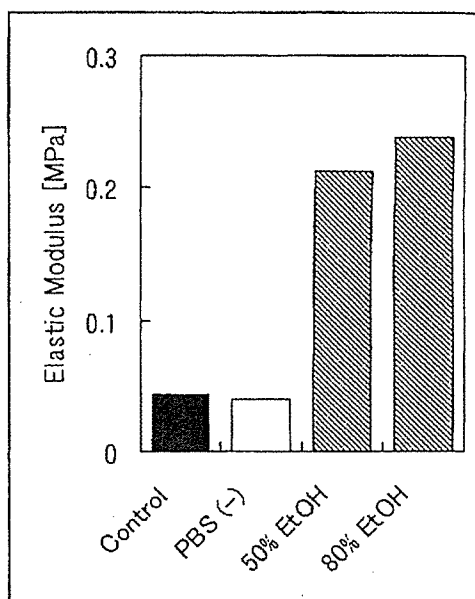


Figure 2. Elastic modulus of the cardiac muscle tissues just after the ultrahigh pressure treatment.

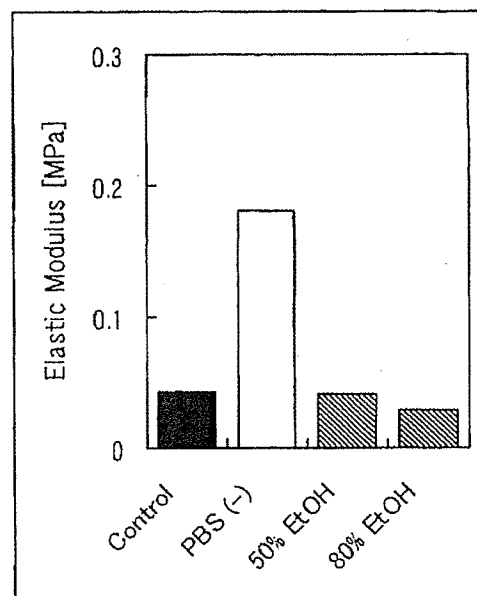


Figure 3. Elastic modulus of the cardiac muscle tissues after the ultrahigh pressure treatment followed by washing process.

O-7-4 ミニブタへの同種脱細胞化動脈の移植における残存リン脂質の影響

鳴海敏行¹、黒岩貴文¹、湊谷謙司¹、吉田謙一²、船本誠一³、寺田堂彦⁴、森反俊幸⁴、永谷憲哉⁵、藤里俊哉¹、岸田晶夫⁵、中谷武嗣¹

¹国立循環器病センター、²先端医療振興財団、³医療機器センター、⁴鈴鹿医療科学大学、⁵東京医科歯科大学

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、自己修復の機転や患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。既に、米国企業やドイツの研究グループによって、脱細胞化同種あるいは異種心臓弁・血管組織の臨床例が報告されつつある。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ある。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。今回は、脱細胞化組織の残存リン脂質の影響について検討した。ドナーとなるクラウン系ミニブタ(株)ジャパンファーム)から下行大動脈を採取した。超高压及び洗浄処理を行うことで、組織内細胞を除去した。さらに、アルコール処理にて残存リン脂質を除去した。同種ミニブタに置換移植した後、所定期間経過後に摘出し、組織学的に評価した。昨年度のミニブタ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。残存リン脂質の除去処理を施したところ、移植後3ヶ月で石灰化はスポット状に僅かに認められたものの、かなり抑制されていた。また、狭窄も見られなかった。移植後の石灰化は、残存リン脂質の影響が大きいと考えられた。

O-7-7 超静水圧処理法によるバイオスキャホールドの調製における圧力印加条件の検討

村越彩子¹、大富美智子¹、吉田謙一²、船本誠一³、南広祐⁴、木村剛⁵、藤里俊哉¹、岸田晶夫⁵、中谷武嗣¹、北村惣一郎⁶

¹東邦大学 理学部生物分子科学科、²先端医療振興財団、³国立循環器病センター研究所 再生医療部、⁴ヒューマンサイエンス振興財団、⁵東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、⁶国立循環器病センター

[緒言] 再生医療においては、スキャホールドの開発が重要である。我々は、生体組織から細胞を除去したバイオスキャホールドの開発を行っている。細胞除去法として、圧力印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣等を除去する超静水圧処理法を考案し、脱細胞化血管、弁の調製を検討している。本法は、細胞除去率が高く、細菌、ドナー由来の内性遺伝子が排除可能であり、生体力学特性も維持される利点を有する。本研究では、初期温度、圧力印加速度などの圧力印加条件の組織構造への影響について検討した。[実験] 成体ブタの大動脈から10mm×10mmの血管試料を調製した。冷間等方圧加圧装置(株)神戸製鋼所)を用いて、様々な初期温度、印加速度、時間にて10000気圧の圧力印加した。組成の異なる洗浄液による所定の時間の浸透洗浄により細胞残渣等を除去した。処理標本の組織断面を顕微鏡観察、電顕観察にて細胞除去、組織構造を評価した。ラット皮下埋入実験を行った。(結果と考察) 印加プロフィール(初期温度、昇圧・保持・減圧時間)の異なる条件で超静水圧を印加し、所定期間にて洗浄した。HE染色処理標本では、いずれの場合も細胞核の除去が示された。また、長時間の印加においても組織構造は保持されていた。ラット皮下埋入実験についても合わせて報告する。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。

P-087 超臨界流体抽出による生体組織の脱細胞化

澤田和也¹、寺田堂彦²、吉田謙一³、船本誠一⁴、藤里俊哉⁵、岸田晶夫⁶、永谷憲哉⁷、中谷武嗣⁸、北村惣一郎⁹

¹大阪成蹊短期大学 総合生活学科、²医療機器センター、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

動物より抽出された心臓弁をバイオスキャホールドとして応用するため、超臨界流体抽出法を応用した脱細胞化の可能性について検討を行った。用いる媒体やエントレーナを選択し、脱DNAや脱リン脂質効果について詳細な検討を行い、最適な処理条件の決定を試みた。また、超臨界流体処理による生体組織の力学安定性も同時に評価した。本報では、従来の脱細胞化手法による効果と超臨界流体抽出による効果を比較しながら発表を行う。

P-092 非石灰化を目指したエラスチン除去バイオスキャホールドの作製

緒方裕之¹、寺田堂彦²、澤田和也³、吉田謙一⁴、船本誠一⁵、藤里俊哉⁶、岸田晶夫⁷、永谷憲哉⁸、中谷武嗣⁹、北村惣一郎¹⁰

¹国立循環器病センター研究所、²財団法人医療機器センター、³大阪成蹊短期大学、⁴先端医療振興センター、⁵東京医科歯科大学

現在、我が国では年間に1万件を越える心臓弁置換手術が行われており、機械弁、もしくはブタ組織をグルタルアルデヒド(GA)で固定化した異種生体弁が用いられている。しかし、機械弁はQOL上の問題を抱え、異種生体弁では石灰化などの問題を抱えている。我々は、再生型人口弁や血管の開発を目指し、脱細胞化したブタ組織の同種移植実験を行っているが、移植後の石灰化も認められており、移植組織の石灰化は抑制すべき課題の一つである。この原因や機構は未だ解明されていないが、生体組織内の構造タンパク質であるエラスチンが関与しているという報告がある。そこで、ブタ大動脈組織内部からエラスチン分解酵素を用いてエラスチンを選択的に除去したバイオスキャホールドの作製について検討を行った。ブタ大動脈をGA水溶液により固定化処理し、その後、エラスターゼ(エラスチン分解酵素)によりエラスチンの分解除去を行った。GA水溶液の濃度、及び処理時間を調節することによって、エラスチンは安定化されずに酵素分解性を保持し、酵素的手法により分解除去が可能であった。また、エラスチンの除去に伴い組織構造が弛緩し、ドナー由来細胞もHE染色では染色されなかった。本方法により、血管組織から石灰化の原因とされるエラスチンを除去することが可能である。エラスチン除去された組織は、石灰化を生じない再生医療用バイオスキャホールドとしての利用が期待出来る。

P-093 放射線照射を前処理とした生体組織の脱細胞化処理

松本誠一¹、吉田謙一²、菊池正博⁴、小林泰彦⁴、藤里俊哉¹、山岡哲二¹、岸田晶夫³、中谷武嗣¹

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東京医科歯科大学, ⁴日本原子力研究開発機構

我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心臓、気管、軟骨等組織から細胞及びウイルス等のドナー由来成分を除去した脱細胞化組織の開発を行っている。脱細胞化組織はそのまま移植用組織として使用することの他、テーラーメイド型として自己細胞や幹細胞等を組み込むための生体スキャフォールドとして利用することができる。既に、独自技術として超高压印加処理を用いた脱細胞化方法を報告しているが、今回は、放射線照射処理を用いた脱細胞化方法について検討した。摘出した食用ブタあるいはミニブタ大動脈をPBSに浸漬し、10Gyから1000Gyの範囲でγ線を照射した。続けて、PBSをベースとする洗浄液にて2週間洗浄した。照射直後と洗浄後の処理組織を組織学的に観察すると共に、組織内残留DNA量を測定した。種々のγ線量による細胞除去について組織学的に検討したところ、γ線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存がみられたが、照射線量が増えるにつれて組織内の核の残存が減少していた。また、残存DNAについても、100Gy以上では大幅に減少する傾向が見られた。これらのことから、γ線照射を前処理とする脱細胞化処理方法は、生体スキャフォールドの作成に有効であることが示唆された。

P-149 超高静水圧処理法による脱細胞化骨・骨髄組織の調製と組織再構築の検討

橋本良秀¹、川喜田正夫¹、吉田謙一²、松本誠一³、木村剛⁴、藤里俊哉¹、岸田晶夫⁴、中谷武嗣⁴、北村惣一郎⁵

¹工学院大学 工学部, ²先端医療振興財団, ³国立循環器病センター 研究所 再生医療部, 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

【緒言】我々は、ドナー由来細胞を除去した生体組織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。細胞除去法として超高静水圧印加と洗浄を組み合わせた超高静水圧処理法を考案した。本法は、血管・弁においては、細胞除去効率が高く、また、細菌、ドナー由来の内因性遺伝子も排除可能であった。本研究では、骨・骨髄組織への超高静水圧処理による骨バイオスキャフォールドの調製と新たな細胞による組織再構築について検討した。【実験】成体ブタの大腿骨（直径約30mm）を購入し、大腿骨体を種々の厚みに切断した。超高静水圧印加装置（株）神戸製鋼所を用いて超高静水圧印加によりドナー由来細胞を破壊し、洗浄により組織内の細胞残渣等を除去した。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。脱細胞化組織に新たな細胞を播種、培養することで組織再構築を検討した。【結果と考察】超高静水圧処理した骨・骨髄組織は、目視観察では顕著な変化は見られず、骨髄腔内においても組織構造は維持されていた。細胞除去を組織切片標本のヘマトキシリン・エオジン染色にて評価した結果、骨および骨髄において細胞は除去されており、骨・骨髄組織においても本法の有用性が示された。得られた脱細胞化骨・骨髄組織への細胞播種による組織再構築についてあわせて報告する。厚生労働省科学研究費ならびに科学技術振興費の補助を受けて行われた。

P-094 ミニブタ置換移植におけるコラーゲン製人工血管への細胞浸潤

黒岩貴文¹、鳴海敏行¹、笹山典久²、湊谷謙司¹、吉田謙一³、松本誠一¹、森反俊幸⁴、白敷昭雄²、永谷憲歳¹、藤里俊哉¹、中谷武嗣¹、高野久輝²

¹国立循環器病センター, ²ニプロ株式会社, ³先端医療振興財団, ⁴鈴鹿医療科学大学

現在、臨床にて使用されている人工血管は、年間約5万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小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。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ている。コラーゲン製人工血管は、主として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吸収並びに組織再生プロファイルを示すと考えられる。今回は、ミニブタを用いた置換移植実験において、人工血管への細胞浸潤について検討した。架橋コラーゲン膜を丸めて作成した長さ約2.5cm、内径約6mmの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、組織学的に評価した。また、人工血管周囲にテフロン製シートによるラッピングを施したものと比較した。移植後の破断等は見られなかった。移植2ヶ月後に摘出したところ、細胞の浸潤は良好で、内腔面への血栓付着も見られなかったが、試料中央部で内膜の増殖によると思われる肥厚化が認められた。これに対し、ラッピングを施したものでは、細胞の浸潤は抑制されていたが、肥厚化は認められなかった。

P-152 再生型筋組織の構築を目的とした脱細胞化筋スキャフォールドの作製

江橋 具¹、松本誠一¹、吉田謙一²、岸田晶夫³、永谷憲歳¹、藤里俊哉¹

¹国立循環器病センター 研究所, ²先端医療振興財団, ³東京医科歯科大学

【目的】筋摘出術や事故などによって筋肉を失った患者に対する治療法として、筋組織の移植が行われる。このとき、患者の移植片を摘出した部位は再生するものの、筋力の低下や組織損傷により患者のQOLは著しく低下する。本研究では、脱細胞化した動物組織をスキャフォールドとして用いた再生型筋組織について検討した。【方法】ブタ筋組織をミリメートルオーダーの厚さにスライスして、超高静水圧印加処理後、洗浄工程により細胞を除去して脱細胞化骨格筋スキャフォールドを作製した。スキャフォールドに播種するための筋芽細胞は、ブタ腎部骨格筋を細切したのちトリプシン消化により組織をばらばらにし、フィルターで結合組織を除去することで遊離した。注射器によるマイクロインジェクション法や遠心操作法などを用いてスキャフォールドに筋芽細胞を播種し、一定期間静置培養後、スキャフォールド内に生着した細胞数を測定した。【結果と考察】ブタ腎部から遊離した細胞は骨格筋特異的なアサミンを発現しており、ディッシュによる単層培養により良好に増殖・継代培養ができたことから、筋芽細胞であることが確認できた。超高静水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化骨格筋スキャフォールドは、筋芽細胞が良好に生着・培養できた。このことから、再生型筋組織を作製できる可能性が示唆された。

130

STATIC CARDIOMYOPLASTY WITH SYNTHETIC ELASTIC NET SUPPRESSES VENTRICULAR DILATATION AND DYSFUNCTION AFTER MYOCARDIAL INFARCTION IN THE RAT

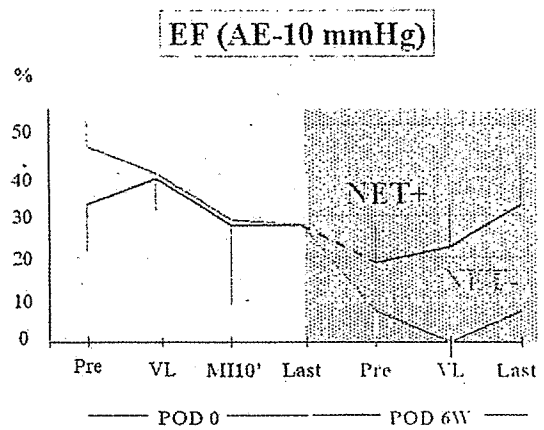
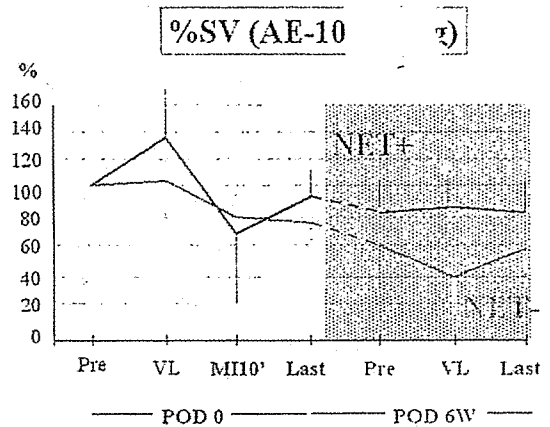
A.T. Kawaguchi,¹ A. Kishida,² T. Yamaoka,³ ¹Cardiovascular Surgery, Tokai University, Isehara, Kanagawa, Japan; ²Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ³Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan

Background: Rapping around the heart may prevent left ventricle (LV) from dilatation but may also interfere with diastolic relaxation. We develop a synthetic net with a dual elasticity; more elastic under a low tension and less elastic with an increasing tension, and tested its effect after induced myocardial infarction in the rat.

Methods: Pressure-volume (PV) relationships were successively analyzed before (PRE), after intravenous volume load (VL), and 10 minutes after occlusion of the left anterior descending artery (MI10'). Rats were then randomized into groups receiving synthetic net around the heart (NET+, n=6) and only partially behind LV (NET-, n=6) and underwent the same PV studies 6 weeks later. End-diastolic and end-systolic PV relationships were defined and LV size and function compared under standardized loading conditions.

Results: Increase in LV end-diastolic and end-systolic volumes were significantly suppressed 6 weeks later in NET+ rats, resulting in significantly preserved stroke volume (Figure: SV) and ejection fraction (Figure: EF) 6 weeks after MI. Presence or absence of net did not yield significant hemodynamic compromise under acute volume load 6 weeks after MI.

Conclusion: Static cardiomyoplasty using synthetic elastic net significantly suppress LV dilatation and dysfunction without restriction immediately and late after MI in the rat. Net material and elasticity need to be adjusted for optimal girdling effect, greatest benefits with least functional compromise.



ポリプレックスによる遺伝子導入機構

○ 山岡哲二^{1,2}、橋本朋子²、北川達哉²、村上章²

1 国立循環器病センター研究所生体工学部

2 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科

yamtel@ri.ncvc.go.jp

近年、ウイルスベクターの危険性が懸念され、非ウイルスベクターに対する期待が高まっている。現在は、ex vivo 遺伝子導入法が主流であるが、臓器の細胞などをターゲットとする場合、外来遺伝子を直接生体に投与するin vivo 直接遺伝子導入の実現が強く望まれている。そこで、体内動態制御が容易なカチオン性高分子が期待されているが、その発現効率はいまだ極めて低く、さらなる改良が強く望まれている。

非ウイルスキャリアーの役割 一般的な、遺伝子導入機構を図1に示した。キャリアーとなるカチオン性分子は、静電的作用によってDNA分子を凝縮し、粒子径約 100nm の微粒子状複合体を形成する。ポリプレックスと呼ばれるこの複合体は、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、小胞に包まれて細胞内を移行すると考えられている。さらに、導入されたDNAはライソゾームから脱出して細胞質に移行し、さらに核内にまで輸送されなければならない。

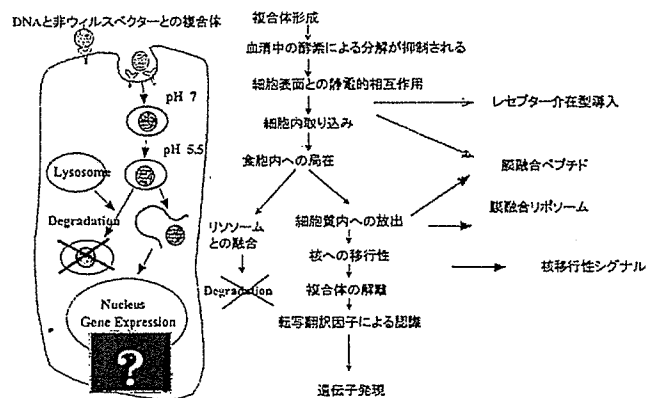


図1 非ウイルス性遺伝子キャリアーを用いた細胞への遺伝子

近年、これらのステップにおける効率を向上させる試みが精力的に進められているが、それに続く、転写効率に関してはほとんど研究されていない。この転写効率こそが、遺伝子導入法におけるファイナルステップである。

ポリカチオンの化学構造の影響 我々の研究グループでは、化学構造の異なる数十種類のポリカチオンを用いて遺伝子導入実験を行った。その結果、ある共通の化学構造を有するポリカチオンのみが高い遺伝子発現を誘導した。すなわち、ポリカチオンが3級(あるいは4級)カチオン基、および水酸基やアミド基などの非電荷親水基を有することが必須である^{1,2}。いずれの化学構造も、ポリプレックスの物理化学的性質および動的性質を大きく変化させることによって、細胞内におけるポリプレックスの転写効率を大きく向上させる³。すなわち、例えば、従来の非ウイルスベクターを用いて、効率よく外来遺伝子を細胞核内に導入できたとしても、この転写効率という最大かつ最終のバリアーをクリアしない限り有効な非ウイルスベクターとは成り得ないことを示している。

さらに、最近、ポリプレックスを形成するポリカチオン分子自身の自己組織化能や、細胞内シグナルにตอบสนองしてDNA分子を放出する刺激応答性などを制御することによっても、転写効率を飛躍的に向上させることが可能となったので併せて発表する。

2Pa175

In vitro 組織再生を目的としたスキャホールド内細胞への遺伝子導入
京工織大繊維¹⁾, 国循セ研²⁾ ○北川達哉^{1,2)}・小堀哲生¹⁾・村上章¹⁾・山岡哲二²⁾

<緒言> *In vitro*で均一な組織を再構築化させる場合の様々な障壁が指摘されている。スキャホールド全体への均一な細胞播種は容易でなく、細胞増殖に伴うスキャホールド深部でのネクロシスも深刻な問題となっており、さらに、十分な細胞増殖速度も得られていない。そこで、血管組織の再構築を目的として、灌流型バイオリアクターを用いた多孔質スキャホールドへの細胞の動的播種法の確立と、灌流培養の諸条件が組織の再構築に与える影響を検討した。一方、スキャホールドから細胞増殖因子タンパクを徐放化する組織再生が多くなされているが、タンパク製剤の安定性に問題があり長期間の効果は期待できない。我々は、タンパクより安定なプラスミドに注目し、スキャホールドからの放出挙動と、スキャホールド内に存在する細胞への遺伝子導入システムを検討した。

<実験> 凍結乾燥法により、ポリ-L-乳酸 (PLLA; Mw=130,000) の中空多孔質スキャホールドを製作した。灌流条件下での細胞播種の可能性を検討するために、様々な濃度(0.05~2.0x10⁶cells/ml)の NIH/3T3 細胞、または、平滑筋細胞(AOSMC)懸濁液を、1.1~11.0 mL/cm² min の灌流速度にてスキャホールドへ送液した。24 時間後に、接着細胞数とスキャホールド内の接着細胞の分布状態を評価した。また、細胞増殖実験では、細胞をスキャホールドへ灌流播種後、引き続き灌流培養を7日間行い、細胞増殖率および、スキャホールド内部での細胞分布状態を比較した。24 時間ごとに培養液を交換し、養分と酸素の有効濃度を維持した。さらに、灌流条件下での遺伝子導入に用いるキャリアー分子として、スキャホールドと疎水的に相互作用可能な疎水性基を付与した poly(DMAPAA-co-MPC-co-stearylacrylate)を合成した。様々な手法によりキャリアー/プラスミド DNA 複合体をスキャホールドに担持させ、その徐放性の検討、および、灌流条件下での細胞への遺伝子導入能について検討した。

<結果・考察> 最適(1.1mL/cm² min)な灌流速度で細胞を播種することで、播種効率ほぼ 100%となり、さらにスキャホールドの表面から深部まで均一に播種することに成功した。細胞を播種後、様々な流速で7日間灌流培養した結果、灌流速度 4.0mL/cm² min では、7日間で約 22 倍に細胞が増殖した。さらに、速度を上昇させるとスキャホールドから細胞が剥離し、最適な灌流速度が組織の再構築に極めて重要であることが示唆された。一方、静置培養では、培養3日目以降では細胞は増殖しなかった。さらに、スキャホールド表面のみでしか細胞は増殖しておらず、壁厚が 1.0mm で十分な連通孔を有するスキャホールドでさえ、深部では、養分および酸素の供給不足のために細胞死に至ることを示している。

スキャホールド内に播種した細胞への遺伝子導入においては、疎水性基を有するカチオン性高分子キャリアーを用いることで、遺伝子/ベクター複合体の徐放化が可能となった。また、その導入効率はポジティブコントロールの PEI と同程度であった(図 1)。放出された複合体が周囲の細胞へ効率よく導入できることが示され、灌流培養下におけるトータルシステムの有用性が強く示唆された。



Fig.1 X-gal staining of PLLA scaffold lumen after 1.1mL/cm²·min perfusion cell seeding for 48h. Complexes were PEI/plasmid(A), and p(D-M-S)/plasmid(B).

Gene transfer on biodegradable porous scaffolds for tissue engineering

Tatsuya KITAGAWA^{1,2)}, Akio KOBORI¹⁾, Akira MURAKAMI¹⁾, and Tetsuji YAMAOKA²⁾ (¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, JAPAN, and ²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, JAPAN)

¹Tel : +81-75-724-7823, Fax : +81-75-724-7800, E-mail : seijo@kit.ac.jp

Keyword: Gene delivery / Porous scaffold / perfusion bioreactor

Abstract: Tissue engineering is very promising strategy to cure tissue defects, but there is not well-established system to achieve the three-dimensional tissue regeneration *in vitro*. In the present study, the effect of oxygen concentration and perfusion rate of medium on the attachment and growth of cells inside the biodegradable PLLA scaffolds using a novel bioreactor were investigated. It was found that 1.1mL/cm²·min perfusion rate is the optimum condition for cell attachment onto the PLLA scaffold and that 4.0mL/cm²·min perfusion rate is adequate for cell growth. Moreover, we tried to establish a novel system for tissue regeneration, which is composed of the incorporation of plasmid DNA into the scaffolds, subsequent sustained release, and direct gene transfer to cells on the scaffolds. The burst phenomenon of DNA was strongly suppressed by use of cationic polymers with hydrophobic groups as gene carriers.

1Pg191

カチオン性/疎水性両親媒性ミセルによる遺伝子導入

¹京工繊大繊維、²国循セ研、³京府医○橋本朋子^{1,2}、小林由美子¹、松田修³、小堀哲生¹、村上章¹、山岡哲二²

【緒言】高い発現を示す非ウイルス性遺伝子キャリアーのための最適な分子設計は未だ定まっていない。我々は、これまでに、従来のポリカチオン分子に親水性基を付与し、ポリプレックスのコンパクションを抑制することで、遺伝子導入機構の最終ステップである転写因子によるポリプレックス認識効率を飛躍的に向上させることに成功してきた。本研究では、全く相反する化学修飾、すなわち、ポリカチオン分子に疎水基を結合させることによる遺伝子導入効率の向上を目指した。従来より、細胞膜との親和性向上を目指した疎水基の利用に関する検討が報告されているが、我々は、カチオン基と疎水基による両親媒性が織りなす疎水化ポリカチオン分子の自己組織化構造が導入遺伝子の細胞内被転写翻訳効率に与える影響に焦点をあてて検討を進めた。

【実験】カチオン性セグメントとして、アルギニンやリジンからなるオリゴペプチド、および、分子量約25000の直鎖状ポリエチレンイミン(I-PEI)などの従来型ポリカチオンを、また、疎水性セグメントとして、飽和脂肪酸、オリゴ乳酸、および、オリゴロイシンを選択し、様々な組み合わせの両親媒性キャリアー分子を合成した。得られた両親媒性キャリアーの水溶液中での自己組織化構造は、疎水プローブであるピレンを用いた蛍光法、および、AFM観察により検討した。また、pCMV-Lucとの複合体形成能をアガロースゲル電気泳動で確認したうえで、ポリプレックスのコンパクションの程度をエチジウムブロマイドの蛍光強度測定にて、さらに、その安定性（ポリプレックスの解離し易さ）はポリビニル硫酸カリウム添加によるポリイオン交換反応にて評価した。これらのキャリアー分子を用いて、*in vitro* クロロキシン処理法によりpCMV-LucをCOS-1細胞へ導入することで、上記の諸因子が発現効率に与える影響について考察した。

【結果・考察】合成した両親媒性のキャリアーは、水溶液中で、疎水性基をコアとしたミセル様の会合体を形成していることが示された。例えば、KRRRKRKRKRKRKRRCのN末端に疎水セグメントLeu_nを結合させた場合、十分な疎水性を有するLeu₁₂を結合させた場合に高分子量の自己組織体がGPCによって確認され、ピレンプローブ法にて求めた臨界ミセル濃度(CMC)は、0.16g/Lであった。また、直鎖状ポリカチオンに疎水基を導入した場合にも、その導入率に依存してミセル構造を形成することがAFMより明らかとなった。これらとプラスミドDNAとのポリプレックスは、プラスミドDNAがミセル状ポリカチオンを取り巻くような形状をとっていると考えられる。両親媒性のキャリアーを用いた遺伝子導入を行った場合、カチオンセグメントのみの場合よりも有意に高い発現効率の向上が示された。直鎖状ポリカチオンの場合には、自己組織化構造を形成することでプラスミドDNAとのエンタングルメントが緩和され、ポリプレックスの解離が容易となり、細胞内被転写効率が向上することで発現効率が有意に高くなったと考えている。一方、比較的低分子量のカチオン性オリゴマーの場合には、自己組織化ミセル構造をとることによるみかけの分子量の増加が与える影響が大きくなり、この分子量増加が発現効率の向上をもたらしたのではないかと考えられる。

Gene transfer with cationic/hydrophobic amphiphilic micelles

Tomoko HASHIMOTO^{1,2}, Yumiko KOBAYASHI¹, Osamu MAZDA³, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹, and Tetsuji YAMAOKA² (¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, JAPAN, ²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, JAPAN, and ³Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, JAPAN)

¹Tel: +81-75-724-7823, Fax: +81-75-724-7800. E-mail: seiho@kit.ac.jp

Keyword: gene transfer / amphiphilic / transcription efficiency / micelle

Absact: An optimum molecular design of effective non-viral gene carriers has not been clarified yet. In the present work, we are focusing on the last step of the gene transfer, the recognition by the transcription factors in cells. We synthesized various amphiphilic-type non-viral gene carriers and investigated the relationship between their self-organization structures in aqueous media and the transcription efficiency *in vitro*. The amphiphilic carriers were found to lead to the improved gene expression resulted from the adequate strength of polyplexes and their easy disassembly.