

Program Number: 203 Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

Bispyrene - conjugated 2' - O - methyloligoribonucleotide as a highly specific RNA - recognition probe and its application to RNA - bio - imaging

A.Murakami¹; A.Mahara²; T.Sakamoto¹; N.Shimada³; T.Yamaoka²

1. *Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan;* 2. *Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan;* 3. *Faculty of Environmental Engineering, The University of Kitakyushu, Kitakyushu, Fukuoka, Japan*

In designing antisense molecules, it is crucial to specify the regions on the target RNA where

Program Number: 207

Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

Synthesis and properties of fluorescent - labeled oligonucleotides containing an amide internucleoside linkage at the 3' - site of 2' - pyrene - modified uridine

R.Iwase^{2,1}; Y.Namie¹; T.Yamaoka³; A.Murakami¹

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;

2. Department of Biosciences, Teikyo University of Science and Technology, Uenohara, Yamanashi, Japan;

3. Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

The duplex formation of oligonucleotide containing 2'-pyrene modified uridine (Upy) with the complementary RNA causes the increase of the pyrene monomer emission. The increase of the fluorescence intensity is attributed to the location of the pyrene group outside of the A-form duplex. To examine the effect of restricted C3'-*endo* conformation of the Upy residue for the enhancement of the fluorescence intensity on the duplex formation, a phosphodiester internucleoside linkage at the 3'-position of Upy residue on the pyrene-labeled oligonucleotide was replaced by an amide internucleoside linkage. We synthesized 3'-carboxymethyl-5'-O-dimethoxytrityl-2'-O-(1-pyrenylmethyl)-3'-deoxyuridine (Uapy) as a building block. By means of H-NMR analysis of Uapy, the furanose ring was found to be fixed in the C3'-*endo* conformation. Incorporation of the Uapy during the synthesis of oligodeoxyribonucleotide was accomplished by the use of PyAOP as the coupling reagent to obtain the pyrene-labeled oligonucleotide with the amide internucleoside linkage at 3'-position of Upy (UapyODN : 5'-dCATGUapyCTAC-3'). The UV-melting temperature (T_m) for the duplex of UapyODN with the complementary RNA was slightly higher than that of the unmodified DNA/RNA duplex. On excitation at 342nm, the duplex of UapyODN with the complementary RNA exhibited the increase of the pyrene monomer emission at 375nm by 7-fold compared to the single-stranded UapyODN. These results suggest that UapyODN has the potential as a fluorescent probe to detect the complementary RNA.

Citation: R.Iwase, Y.Namie, T.Yamaoka, A.Murakami. Synthesis and properties of fluorescent - labeled oligonucleotides containing an amide internucleoside linkage at the 3' - site of 2' - pyrene - modified uridine. Program No. 207. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Abstract Viewer

O-29-7 造血幹細胞特異的スキャホルドの評価

山岡哲二¹, 松村剛毅², 馬原 淳¹, 村上 章³, 新岡俊治³

¹国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部, ²東京女子医科大学, ³京都工芸繊維大学

【目的】本研究では、造血幹細胞を選択的に吸着する生体吸収性スキャホルドを開発することで、FACS法や磁気ビーズ法による単離をせずに、採取した骨髓細胞を直接接種して、移植できる治療システムの構築を目指した。【方法】すでに血管再生用スキャホルドとして用いられているポリ(L乳酸-co-ε-カプロラクトン)の多孔質体の表面を、NaOHで加水分解することで、その表面にカルボキシル基を導入し、カルボジイミド法により抗ヒトCD34マウスIgG抗体を固定化した。スキャホルド表面に残存した活性化カルボキシル基は、2-アミノエタノールでキャッピングした。固定化された抗体量を、HRP標識された抗マウスIgGゴットIgG抗体を用いて間接的に定量化した結果、30ng/スキャホルドであった。【結果】抗体修飾スキャホルド上に、CD34抗原マーカーをもつヒト白血球由来のKG-1a細胞、および、CD34陰性のHL60細胞の混合懸濁液(2×10⁶個/50ml)を、流速0.05ml/minで播種し、選択的細胞接着の効率を、FACS法により評価した。比較のために、未処理スキャホルド、および、アルカリ加水分解の後、カルボジイミド法により2-アミノエタノールのみを固定化したコントロールスキャホルドも同様に評価したところ、抗CD34抗体固定化スキャホルドでは約80%の標的細胞濃縮率が得られた。

O-29-1 抗体固定化カラムを用いた幹細胞分離システムの開発

馬原 淳, 山岡哲二

国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

【目的】組織再生治療で用いる幹細胞は、再生効率と安全性の観点から分化に関与する均一な細胞群である事が望まれる。しかし、磁気ビーズ法などの細胞表面マーカーの有無による選別法では細胞の純度を必ずしも確保できない。そこで本研究では、白血球ローリングを模倣した新規細胞分離カラムを開発し、細胞表面マーカー密度の違いをも分離できるカラムシステムを開発した。【方法】内径1mmのポリエチレンチューブ対して、オゾン処理後、表面にポリアクリル酸のグラフト鎖を重合した。得られたポリアクリル酸に対してカルボジイミドにより抗ヒトCD34抗体を固定化し、ペルオキシダーゼにより固定化抗体量を定量化した。その後、このカラムに対してCD34陽性細胞であるKG-1aおよび、陰性細胞であるHL60を通液し、FACSにより回収したフラクション内に含まれる細胞量を定量化した。【結果】カラム内空に固定化されている抗CD34抗体量は200 μg/m²であった。このカラムに対してKG-1a細胞を通液後各フラクションの細胞数を測定した結果、2つの溶出ピークが確認できた。これは、HL60細胞を通液した場合、ならびに抗ヒトCD34抗体を固定化していないチューブの場合には見られなかった。さらにこの2つのピークではCD34抗体密度が異なることから、表面マーカー密度の違いにより細胞が分離されていることが示唆された。

O-31-2 両親媒性遺伝子キャリアーのナノ構造と遺伝子導入効率

橋本朋子¹, 小堀哲生¹, 村上 章¹, 山岡哲二²

¹京都工芸繊維大学 繊維学部 高分子学科, ²国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

組織再生や移植用血管床の構築を目指した増殖因子の利用が精力的に検討されているが、生体内安定性に劣る増殖因子の徐放化では長期の効果は期待できない。近年、非ウイルスキャリアーを用いた増殖因子遺伝子の導入による改善が期待されるものの、その遺伝子発現には未だ問題が残る。我々は、非ウイルスキャリアーの諸物性を最適化することで、導入遺伝子発現効率の向上を図ってきた。今回は、疎水性基を含むキャリアーとしてステアaryl基などの疎水性基を付与したL-PEIや細胞内酵素分解性オリゴペプチドを設計した。前者はPEIの側鎖反応によって、また、後者は従来の固相ペプチド合成法により調製した。これら両親媒性のキャリアーを用いて培養細胞への遺伝子導入を行った結果、カチオン性のみキャリアーに比較して高い発現効率を得られた。これらのキャリアー分子は、水環境下で明確な臨界ミセル濃度を示し、ステアaryl基をコアとしたミセル様の形状を取ることが示された。また、この形状変化が、DNA分子とのポリプレックス形成挙動に影響を与え、さらに、ポリプレックスとポリアニオンとのポリイオン交換反応を促進するなど、特徴的な動的特性を示すことが明らかとなった。これらの動的現象の結果、遺伝子発現効率が向上したと考えられる。さらに、このミセル形状を取るキャリアーを用いた諸細胞環境での遺伝子導入結果も併せて報告する。

P-070 軟組織再生を目的としたHAp複合化ハイドロゲルのin vivo生体吸収性・組織適合性の評価

中村友亮¹, 小堀哲生¹, 村上 章¹, 山岡哲二²

¹京都工芸繊維大学 繊維学部 高分子学科, ²国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部

【目的】組織親和性に優れたコラーゲンやその複合体の軟組織再生用スキャホルド材料としての有用性が高く評価されているが、生体由来であるために、抗原性や異物混入等の問題点が指摘されている。そこで我々は、コラーゲンに代わり、軟組織親和性を有するハイドロキシアパタイト(HAp)を複合化したポリ乳酸誘導体ハイドロゲルの軟組織再生への応用を検討してきた。今回は、ラット皮下への長期間埋入におけるHAp複合化ハイドロゲルの分解挙動、浸潤組織の評価を中心に発表する。【方法】直接脱水重合法により合成したポリ乳酸とポリエーテルのマルチブロック共重合体を合成後、交互浸漬法によりHAp複合化ハイドロゲルとした。その後、ラット皮下に埋入1、2、および4ヶ月後のHAp複合化ハイドロゲルの生体吸収性、浸潤組織中のコラーゲン組織量の定量化を行った。【結果】ラット皮下埋入実験の結果、浸潤組織、カプセル化層より良好な軟組織親和性が確認された。中でも、ポリエーテル組成の高いHAp複合化ハイドロゲルは、4ヶ月でほぼすべてが生体吸収され、HAp複合化することで浸潤組織中のコラーゲン組織量の割合が上昇した。また、コラーゲンコートハイドロゲルとの軟組織親和性の比較についても合わせて報告する。

Transaction: 170

Citation: Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, page 167

Fabrication And Cell Adhesion Of 3d Scaffold Made Of Composite Material With A Silk Fibroin Substrate To Develop A Percutaneous Device

T. Furuzono¹, M. Okada¹, A. Kishida¹, J. Tanaka², S. Yasuda¹

¹ National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan, ² National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Introduction

To prevent germ infection, various materials such as tantalum, silicone, polyester, carbon, polypropylene, alumina, polyurethane, titanium, collagen and hydroxyapatite (HAp), have been applied to percutaneous devices since 1950 but sufficient results have not been clinically obtained. A novel inorganic-organic composite has been under development aiming at producing a percutaneous device which displays adhesiveness between soft tissue and a material surface.¹ Attention in the development of the composite has been placed on excellent bioactivity of HAp for hard or soft tissues as the inorganic content in this process. In this article, a prototype of a percutaneous device made of an inorganic-organic composite consisting of nano-scaled sintered HAp particles and silk fibroin (SF) via covalent bonding between the interface is presented.

Materials and Methods

Nano-scaled HAp particles were prepared by an alternating emulsion system, sintered at 800°C for 1h.² The size of the sintered HAp particles showed an a-axis length of 87 ± 23 nm, a c-axis length of 236 ± 81 nm and an aspect ratio (*c/a*) of 2.72 by transmission electron micrograph observation (*n*=100). Degummed fibers with 27-denier or *habutae* fabric made of silk from *Bombyx mori* were used as polymer substrate. Graft-polymerization with γ -methacryloxypropyl trimethoxysilane (MPTS) on the SF was conducted by free radical initiation. After the HAp particles were suspended in a toluene/methanol (9/1) mixture solvent, a poly(MPTS)-grafted SF fibers were soaked in the suspended solution. The fibers adsorbed with HAp were heated at 120°C for 2h in vacuum at 1mmHg for a reaction between the HAp surface and the alkoxy silyl groups of the graft polymers to donate covalent bonding. A polymer substrate for a button form was molded using a silicone compound. HAp/SF fibers of about 100 μ m in length thoroughly coated the buttons. To detect initial cell adhesiveness on the samples, fibroblast morphologies were observed by SEM.

Results and Discussion

The weight gain of poly(MPTS) on SF increased with increasing the reaction time, eventually reaching a plateau value of about 15 wt%. Fig. 1 shows an SEM photograph of the sintered HAp-coated SF fiber with 13.1 ± 1.2 wt% (*n*=4) in the composite determined by TGA. The weight gain of HAp particles on the SF fiber increased about 5 times compared to that on the SF fabric, 2.8 ± 0.5 wt% by the same preparation conditions. This means that it is hard for nano-HAp particles to penetrate into and coat on gaps between fibers in the SF fabric. The HAp particles separated or aggregated into several crystals under SEM observation. Aggregation was easy because the HAp mono-particle has an a-plane with a cationic charge and a c-plane with an anionic charge in a mono-crystal. To fabricate a prototype for a percutaneous device, the HAp-coated SF fibers were transplanted onto a button-shaped substrate made of silicone via an adhesive agent. The HAp-coated SF fibers of 100 μ m in length were uniformly transplanted individually in random directions on the button. To evaluate the cell adhesiveness on the HAp-coated SF, the morphologies of L929 fibroblast cells incubated on sample fabrics or devices were observed by SEM. It is clear that cells favorably adhere only on the HAp surface of the composite but not on the dehydrated

grafted-surface without HAp particles on the SF substrate. It is estimated that cell-adhesion proteins in serum, such as fibronectin, vitronectin, bFGF, etc., prior to cell adhesion, adsorb on a HAp surface much better than on an area of dehydrated graft-polymer.

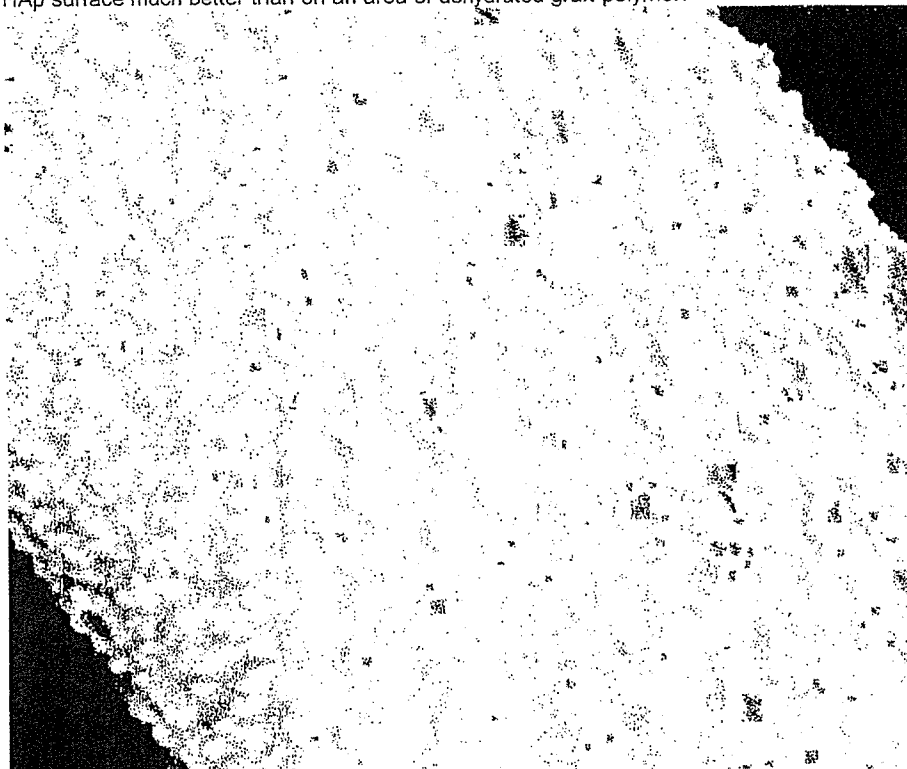


Fig. 1. SEM photograph of HAp particles covalently coated on an SF fiber.

Conclusions

HAp single-crystals showing high crystalline HAp were covalently coated on an SF substrate via poly(MPTS)-grafted SF. The HAp coating was thoroughly effective for improving the adhesiveness of the fibroblast cells. In our research, a model of a percutaneous device made of a composite coated on a silicone substrate was designed. HAp-coated SF fibers of about 100 μm in length were transplanted onto the surface of buttons made of a silicone compound via an adhesive. The device was a white and had good flexibility. Cells were able to penetrate into the gaps between the inorganic/organic composite fibers with in three-dimensional tangle. Soft tissue is expected to behave in a manner similar to the penetration of the cells into the three-dimensional scaffold. Animal experiments with a percutaneous implantation using the button for short to long periods are now progressing in order to see infection-protection results brought about by adhesiveness to skin tissue.

References

1. Furuzono T., *et al.*, *J Mater Sci Mater Med* 2004;15: 19-23
2. Furuzono T., *et al.*, *J. Mater Sci Lett* 2001;20: 1205-1212.
3. Furuzono T., *et al.*, *J Artif Organs*, in press.

Acknowledgements

This study was financially supported in part by PRESTO, JST.

(15) リン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲンゲルの作製と *in vitro* での評価

(東京医歯大生材研¹、ヒューマンサイエンス振興財団²) Kwangwoo Nam^{1, 2}, 木村 剛¹、岸田 晶夫¹
E-mail: bloodnam.fm@tmd.ac.jp
電話: 03-5280-8029 FAX: 03-5280-8005

【緒論】

コラーゲンは哺乳動物中の全たんぱく質の3分の1を占め、細胞の支持物質の構成成分として生物の保護及び支持など物理的機能を有する。これまでコラーゲンをバイオマテリアルとして生体に利用するため、コラーゲンの架橋による物性や生物的特性の改善に関する研究が多く行われている。しかしながら、架橋剤を使うことによる様々な問題が生じる可能性があるため、慎重な架橋方法を選択が必要とされる。

本研究では優秀な血液適合性を示す2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーをコラーゲンゲルに固定化したリン脂質ポリマーハイブリッドコラーゲンゲルを作製した。種々の条件にてハイブリッドゲルを作製し、その物性と細胞接着性等を分析し、組織再生用ポリマーマトリックスとしての可能性を検討した。

【実験】

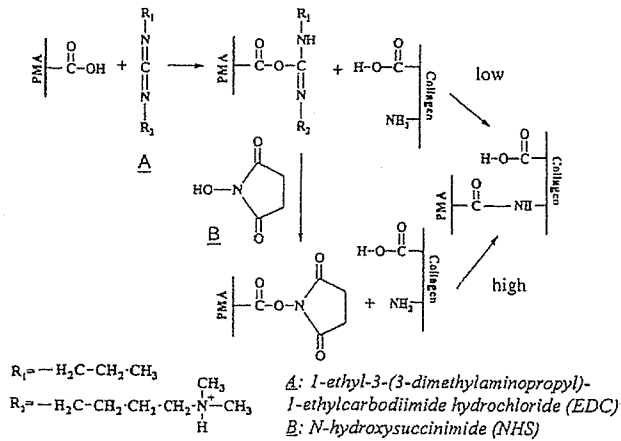
まず、コラーゲン0.5wt%水溶液からコラーゲンフィルムを調製した。コラーゲンフィルムを1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) と N-hydroxysuccinimide (NHS) を含有する2-morpholinoethane sulfonic acid (MES)水溶液中に浸漬し、4時間架橋させ、コラーゲンゲルを得た(E/Nゲル)¹⁾。MPCポリマーをE/Nゲルと架橋させるため、カルボキシル基を有するpoly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA) 選択し、MES水溶液中でEDCとNHSと反応させPMAのカルボキシル基を活性化させた。その後、E/Nゲルを加え4°Cで4時間反応させMPCと架橋されたコラーゲンゲル(MPC-immobilized collagen gel: MiCゲル)を得た。架橋メカニズムをScheme 1に示す。さらにMPCの固定化過程を再度行いPMAの含有率の高いコラーゲンゲルを得た(MPC-doubled collagen gel: MdCゲル)。

架橋されていないコラーゲンゲル(U-ゲル)、E/Nゲル、MiCゲルの化学的特性と力学物性と表面分析、膨潤実験、生体分解性を等により検討し、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。さらに、細胞実験によりコラーゲンゲルの細胞適合性を検討した。

【結果と考察】

架橋されていないコラーゲンフィルムは酸性条件(pH=2.1)のMES水溶液中で解け、中性とアルカリ性条件では膨潤した。EDCとNHSを溶かした

MES水溶液中にコラーゲンフィルムを浸漬した場合、pHと関係なく全て膨潤し、ゲル化した。しかし、pHによってゲル化傾向が大きく異なり、酸性条件での膨潤度はアルカリ性条件での膨潤度に比べ約4.5倍大きくなった。これはEDCとカルボキシル基との反応によるものの、



Scheme 1. Schematic picture of cross-linking of PMA with collagen.

カルボキシル基はEDCと反応するためにはカルボキシオン化する必要があるからである^{1,2)}。

X線光電子分光解析法を使ってPMAの固定化を確認した。リンピーク(134eV)はMiCゲルとMdCゲルに認められたが、架橋されていないコラーゲンゲルとE/Nゲルでは認められなかった。走査電子顕微鏡でゲルの表面観察した結果、未架橋ゲル(U-ゲル)では凸凹がおり架橋ゲル(E/N-ゲル、MiCゲル、MdCゲル)は平らであった。(Figure 1)。MiCゲルの断面は多孔性構造の内部と緻密な構造の外部の層分離されていることが分かった。MdCゲルの場合、外部の緻密な層が厚くなったことからPMAはコラーゲンゲルの表面に固定化されていることが明らかとなった。

PMA導入による物性の変化は示差走査熱量計(DSC)と引張り実験で行った。EDCとNHSのみ使用した場合、コラーゲン繊維はネットワークを形成し、ゲルの物性を増加させる。しかしながら、コラーゲンを構成している α ヘリックス間の架橋でしかないため、力学的物性の増加には限界があると考えられる。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るためさらなる強度のゲルが出来上がる。DSCによるコラーゲンゲルの収縮温度 T_c を測定した結果、PMAが固定化されたゲルの収縮温度が最も高かった。これはPMAの導入により緻密なネットワークが形成されたことを示している。また、引張強度はMiCの場合、U-ゲルに比べ約12.8倍であった。(Figure 2)。

膨潤実験の結果、全てのゲルにおいて酸性条件での膨潤度が高く、中性条件での膨潤度が低く、また、ゲルが架橋されると酸性条件と中性条件とも膨潤度が低かった。これは、未反応のアミン基の存在を示しており、PMAの架橋密度が向上し膨潤度が低くなったと考えられる。

コラーゲナーゼによる生分解性を調べた結果、架橋度が上がると共に分解が遅くなった。コラーゲナーゼはヘリックスを切断する。PMAの固定化は水の吸収を抑制し、コラーゲナーゼの浸透を防ぐ効果があると考えられ、コラーゲナーゼが吸収されてヘリックスが分解された場合でもPMAとコラーゲン間の結合が維持され、分解速度は遅くなると考えられる。これは低い膨潤度と緻密なネットワーク形成により、コラーゲナーゼがゲル中に浸透し難いからであること意味する。さらに、各コラーゲンゲルの細胞との接着関係についても報告する。

【謝辞】

本研究は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業費(KH6106)、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

【参考文献】

1. L. H. H. Olde Damink et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **6** (1995) 460-472.
2. N. Nakajima et al., *Bioconjugate Chem.* **6** (1995) 123-130.

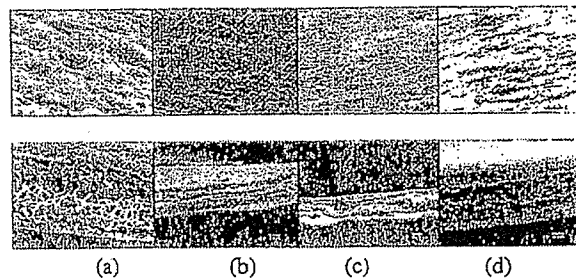


Figure 1. Morphological picture of (a) Uncross-linked collagen gel, (b) E/N gel, (c) MiC gel, and (d) MdC gel. Upper picture shows the outer surfaces and below picture shows the fractured surfaces.

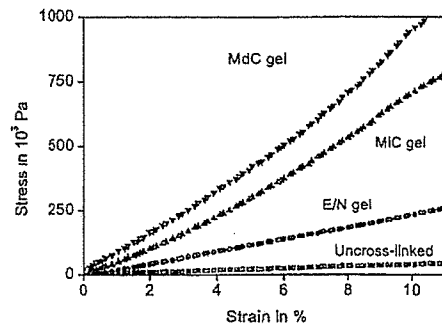


Figure 2. Stress-strain curve of each collagen gels.

X SO 精密バイオインターフェイスポリマー
 —Introductory Remarks—

(東京大学大学院工学系研究科) 石原 一彦
 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所) 岸田 晶夫

健康で楽しい生活を続けたいと願う気持ちは万人が持つものであり、これを支える医療が果たす役割はますます重要となってきた。ゲノム解析に伴い個々に合ったテーラーメイド医療、ターゲット医療、バイオ分子・細胞を対象としたナノ医療、再生医療あるいは医療デバイス技術の向上による低侵襲医療が強く求められている。さらに在宅での日々の健康管理に役立つデバイスの開発が、医療費の爆発的な高騰を抑制するための予防医学を発展させるであろう。

このように新しい医療を展開するためには、これに対応できる技術を駆使してデバイスを創製しなくてはならない。今回、“精密バイオインターフェイスポリマー”を特定テーマとして取り上げた。対象が生体、あるいはそれに関連したバイオ分子である限りデバイスの創製にあたり、ポリマーマテリアルとのインターフェイスにおける生体反応の抑制が極めて重要な課題である。医療デバイスが生体反応のために使えなくなることは稀ではない。一方では生体反応を巧妙に利用して、多成分から標的分子・細胞の選択認識を行うことも可能である。これらはバイオインターフェイスの制御いかんに関わることである。生体の機能に近づき、さらにこれを越える性能を引き出すためのポリマーデザイン、インターフェイスの処理手法、新しい高機能医療デバイスの創製など様々な観点からバイオインターフェイスポリマーの先端研究を議論したいと考える。

工学と医学・薬学の連携は、“バイオ”というカテゴリーを共有することで融合し、刺激しあいながら発展する。さらにバイオ工学という観点に立った場合、バイオインターフェイスの構築は高分子科学の領域を超えて、機械、電気、電子、化学工学、あるいは環境、エネルギーなど全ての工学を統合するキーワードであることは間違いない。健康で楽しい暮らしが永く続けられる社会に必要な高度技術を支えるバイオインターフェイスの構築に将来にわたり大きな可能性を見つけられる。

本特定テーマでは、バイオインターフェイスのポリマーサイエンスに携わる研究者間で、特に精密分子設計・制御・合成を意識した観点から未来型医療の基盤となる新規な高機能バイオインターフェイスの構築を目指して、討論する。

Precise Design of Biointerface Polymers

Kazuhiko ISHIHARA (Department of Materials Engineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8656 Japan)

Tel 03-5841-7124, Fax 03-5841-8647, e-mail ishihara@bmmw.t.u-tokyo.ac.jp

Akio KISHIDA (Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, 101-0062 Japan)

Tel 03-5280-8028, Fax 03-5280-8007, e-mail kishida.fm@tmd.ac.jp

論文賞

MA-1 Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite IV. Fabrication and cell adhesion properties of a three-dimensional scaffold made of composite material with a silk fibroin substrate to develop a percutaneous device

国立循環器病センター研究所生体工学部¹⁾, 国立循環器病センター心臓血管内科²⁾, 物質・材料研究機構生体材料研究センター³⁾

古菌 勉¹⁾, 安田 昌司¹⁾*, 木村 剛¹⁾** , 京谷 晋吾²⁾, 田中 順三³⁾, 岸田 晶夫¹⁾**

「体に医療機器を装着しながら健常者と同じように生活できる」

これが我々の夢である。しかしながら「細菌感染」がこの実現を妨げている。米国の報告によると静脈留置カテーテル関連の感染は院内感染の原因として最多とされている。これまで経皮部からの感染防止デバイスや抗菌剤を担持したデバイスが数多く開発されたが、満足いく効能が得られていないのが現状である。現在では材料工学的に何ら手を加えていないカテーテルが一般的であり、医療従事者による消毒の励行やカテーテル取り扱い方法の徹底教育など人手を介した管理による感染対策が強いられている。

当該論文では、我々は以上のことを踏まえ、カテーテル感染を低減できる新規ナノ無機・有機複合材料の設計・製造およびデバイス製造法について報告した。新材料設計のコンセプトは、「硬い・脆いといったハイドロキシアパタイト(HAp)セラミックス固有の欠点を補い、HApの生体親和性を損なうことなく柔軟性を付与したソフトセラミックスを創出することにある。それは「HAp単結晶体のナノスケールでの粒径・形態制御技術」および「共有結合による無機・有機複合化技術」の二つの基盤技術より成り立っている。

本受賞講演では、無機・有機複合材料およびデバイス製造技術について説明するとともに、動物実験等を含めた現在の進捗状況を紹介する。

【現所属】

*科学技術振興機構研究成果活用プラザ大阪

**東京医科歯科大学生体材料工学研究所



細胞デリバリー

(東京医科歯科大学生体材料工学研究所) 岸田 晶夫
電話&FAX 03-5280-8028 E-mail kishida.fm@tmd.ac.jp

1. はじめに

細胞は、輸血、骨髄移植および免疫細胞療法などにおいて、疾病治療に用いられてきた。近年、再生医療および遺伝子治療の概念の導入とともに、細胞を“デリバリー”することが重要となり、特に再生医療においては、必要不可欠の技術となりつつある。本稿では、「細胞デリバリー」の考え方を整理し、これに用いられている技術、および今後開発が望まれているデバイスなどについて概観する。

2. 細胞デリバリーの分類

a) 細胞を生体内に直接送達する

最も単純な細胞デリバリー法で、すでに臨床で用いられている。虚血性疾患治療のための骨髄細胞注入では、分離した骨髄幹細胞をマーキングされた患部に直接、注射する手法がとられている。また、他項で紹介される血管内カテーテルを用いて心臓に骨髄細胞を注入する方法もある。本法は簡便であるため広く用いられるが、心筋や筋肉あるいは血管壁などに注入する場合には、組織の密度が高いため、注入した細胞浮遊液が溢れ出し、細胞を患部にとどめることが困難な場合がある。ゼラチンなどで粘性を高めた浮遊液を調製する試みも提案されているが、注射針から射出する際の圧力が高くなるため、手持ちでは定量的に吐出することが困難であり、また細胞の Viability や変性等が懸念される。

b) 細胞を担体に担持させて生体内に送達する

上記と同様に細胞を生体内に移植する際に、担体を使用する方法が提案されている。糖尿病治療のための膵島細胞の移植については、拒絶反応を回避するためのマイクロカプセルへの内包の研究がよく知られている。これに加えて、セラミクス多孔質体、ハイドロゲル、生分解性スポンジやメッシュなど多くの担体が研究されている。これらの担体に細胞を担持させることにより、生体内で一定の細胞密度を保ち、また細胞機能発現を促進することが期待される。また、生体内に移植する際には担体からはずして使用するが、感温性培養皿を用いた細胞シートも、この分類の変法と考えられる。

c) 細胞を2次元 Scaffold に送達する

再生医療だけでなく、細胞機能探索のためには、細胞の集団形成、あるいは2種類以上の細胞を共培養する技術が必要である。これを実現するために、培養基盤表面をマイクロ加工したり、インクジェットプリンター (micro droplet 法) や細胞吐出装置を備えた細胞ディスペンサーを用いた2次元配置法が研究されている。細胞の接着面積や接着斑の分布が細胞の機能発現に影響するとの報告がある。

d) 細胞を3次元 Scaffold に送達する

再生医療のコンセプトを確立した方法が、生分解性3次元スキャフォールドに細胞を播種したものであった。現在では、単純な播種だけでなく、スキャフォールド内部への送達を目指した細胞インジェクションなども研究されている。また、バイオリアクタータイプ

の人工肝臓や人工腎臓ではホローファイバー上への細胞の播種が問題となる。

3. 要素技術について

細胞デリバリーの基盤技術として、スキャフォールド、カプセルおよび接着基盤などに関連する材料工学と精密配置やディスペンス技術に関連する機械工学が重要である。一般的に材料工学者の考案する細胞デリバリーでは、フィルム、ファイバーなどのスキャフォールド形態に成形したのちに細胞を組み込む。細胞の接着や機能制御については、表面の化学的性質を制御することができる。精密配置やディスペンス技術については、3次元位置決め技術や微小液滴吐出技術などが応用されている。これら両者の技術を組み合わせることによって、複雑な形状でさらに細胞が組み込まれているスキャフォールドの作製や、また生体内組織への細胞注入が可能になる。特に心筋や虚血部位への細胞注入について、注入位置の精緻化、注入細胞量の定量化、注入部位での残存性などが課題となっており、この解決には材料工学と機械工学の双方の技術開発が必要である。

4. 細胞デリバリーの必要性の実例

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。ミニブタ大動脈から超高静水圧印加処理にてドナー由来細胞を除去し、これをそのままミニブタに同種移植を行う場合と、血管内皮細胞、血管壁細胞等を生体スキャフォールドに播種して *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。組織観察の結果、血管内腔面はすみやかに血管内皮細胞様細胞に覆われ、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。しかし、部分的に石灰化および内膜肥厚が観察された。一方、*in vitro* で再細胞化された場合では、内腔面の血管内皮細胞は血流にさらされても脱落することなく存在しており、また内膜肥厚や石灰化も抑制されていた。

in vitro で再細胞化する場合には、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、汎用ディスペンサー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、汎用ディスペンサー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った。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。

(S2・23) 新しい分子間相互作用の制御法を駆使したバイオマテリアル創製

東京医科歯科大学生体材料工学研究所 ○岸田晶夫, 木村 剛
国立循環器病センター研究所生体工学部 古藺 勉
岡山大学環境理工学部 吉澤秀和

【緒言】近年、分子レベルで制御された超分子集合体が注目されており、静電的相互作用、疎水性相互作用など種々の相互作用を利用した検討が行われている。我々は高圧条件下での水素結合性の強化に注目し、水素結合性高分子であるポリビニルアルコール(PVA)を用い、分子間力として水素結合を駆動力とした構造体(ゲル)の調製について報告してきた。本研究では、超高压処理によるPVA構造体形成と他の水素結合成分(DNA)との複合体形成について検討し、有機・無機・金属材料に応用できる水素結合の広範な応用性を生かしたバイオマテリアル創製の基礎検討を行った。

【実験】PVAに所定量の精製水を加え、オートクレーブにより完全に溶解させ、0.01~1 w/v% PVA水溶液を調製した。PVA単独構造体はポリエチレン袋にPVA水溶液のみを、PVA複合化複合体はPVA水溶液にDNA水溶液もしくはハイドロキシアパタイトナノ粒子を添加後、密封し、40℃において10,000気圧で所定時間処理した。得られた構造体は、走査型電子顕微鏡(SEM)、動的光散乱測定(DLS)あるいは紫外可視分光計(UV-VIS分光計)を用いて評価した。

【結果】10,000気圧で超高压処理した場合、処理時間1分以上において溶液の白濁が観察され、構造体の形成が示唆された。PVA濃度の増加に伴って白濁の生成量が増加し、静置状態において沈殿が得られた。SEM観察により、沈殿あるいは上澄み液中に数百ナノメートルサイズの微粒子の形成が確認できた。DNAとの複合化では、UV-VIS分光計により上澄み液のDNA濃度を定量することで、沈殿物がPVAとDNAからなる複合体であることがわかった。濃度を制御することで、PVA-DNAナノ粒子が得られ、遺伝子デリバリー担体としての応用が考えられた。また無機ナノ粒子を混合して超高压処理することにより、有機-無機ハイブリッドゲル粒子が得られた。この粒子は細胞との親和性が高く、かつタンパク質の保持も可能である。このように、超高压処理を用いた水素結合形成により、種々の複合体が得られ、新しいバイオマテリアル創製のための基盤技術としての有用性が示された。

Host Cell Infiltration to Implanted Vascular Grafts Made of Collagen Fibers in Porcine Model

Toshia Fujisato¹, Norihisa Sasayama², Kenji Minatoya², Kenichi Yoshida¹, Seiichi Funamoto¹, Akio Kishida⁴, Akio Shirasu², Takeshi Nakatani³, Hisateru Takano² and Hiroyuki Hattori²

¹Regenerative Medicine & Tissue Engineering, ²Cardiovascular Surgery, and ³Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

⁴Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

²Research & Development Laboratory, Nipro Corporation, Shiga, Japan

Statement of Purpose: The artificial synthetic vascular grafts have been clinically established for large diameter vessels but not for small diameter less than 4 mm because of thrombosis. The allografts or homografts which are donated from the cadavers are useful especially in the infected area, however the supply is limited. The regenerative vascular grafts which may be replaced by the host tissue after the implantation may have growth potential and be applicable to the pediatric patients. Prof. Shin'oka (Tokyo Women's Medical Univ.) has already applied PGCL vein graft (pulmonary artery) to about 50 pediatric patients and reported good clinical results. However, the biodegradable graft may not be applicable to the artery because of its rupture due to biodegradation. We are developing vascular grafts made of collagen fibers. The collagen grafts may be digested by infiltrated cells and show a different degradation profile from that of the biodegradable materials which are hydrolyzed even out of the living body. In this presentation, a regenerative profile of our collagen graft was studied in a porcine model.

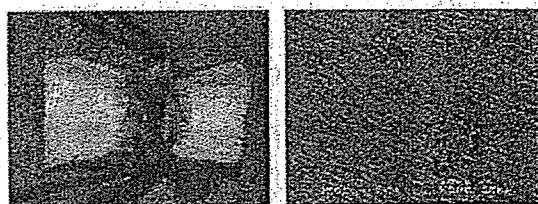
Methods: Porcine skin collagen solution was extruded in ethanol to form collagen fibers. They were then collected and pressed to have non-woven fabrics sheets. The obtained collagen sheets were rolled and immersed in collagen solution followed by crosslinking in a vacuum oven. The inner diameter and length of the grafts were about 7 mm and about 2.5 cm, respectively. The collagen vascular grafts were implanted at descending aorta of the 6 Clawn miniature pigs (Japan Farm Co., Ltd.) through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. They were then explanted at 4 or 8 weeks after the implantation 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 / Discussion

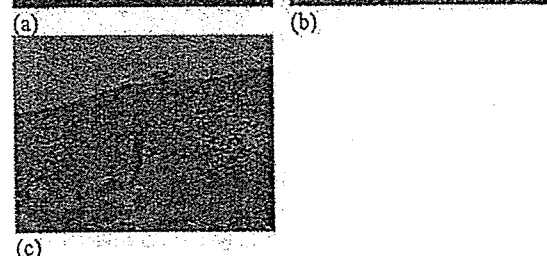
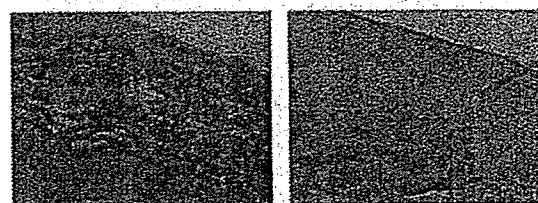
The treated animals survived after the implantation in all cases. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis (Fig.1a) at 4 and 8 weeks after the implantation. The inner surfaces were smooth and had no thrombus formation (Fig. 1b). Cell infiltration of smooth muscle cells and fibroblasts was identified at 4 weeks, and intimal thickening was observed at 8 weeks after the implantation (Fig. 2a,2c). The luminal surfaces of the aorta were partly covered with endothelial cells (Fig.2b). There was no calcification detected in the

explanted tissues. However, stenosis was observed in the middle region of the graft due to the intimal thickening by the smooth muscle cells in the region at 8 weeks.

Conclusions: The novel regenerative collagen graft may be useful in the aortic system. The graft was easily infiltrated by the host cells and may be substituted by the host collagen and elastin. After the completion of the host tissue substitution, the graft may have growth potential and be applied to the pediatric patients. We are now investigating the mechanism of intimal thickening of the grafts.



(a) (b)
Fig.1 (a) The explanted vascular graft and (b) the SEM photograph of its inner surface near the anastomosis at 8 weeks after the implantation.



(a) (b) (c)
Fig.1 (a) HE, (b) anti-vWF and (c) anti-aSMA stainings of the explanted vascular graft at 8 weeks after the implantation.

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.

生物組織の再生医療への応用

藤里 俊哉¹・岸田 晶夫²・湊谷 謙司³・庭谷 和夫³・中谷 武嗣³・北村 惣一郎³
 国立循環器病センター研究所 再生医療部¹
 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所²
 国立循環器病センター³

Application of biological tissues as tissue engineering scaffolds

Toshiya Fujisato¹, Akio Kishida², Kenji Minatoya³, Kazuo Niwaya³, Takeshi Nakatani³, Soichiro Kitamura³

Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center Research Institute¹

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University²

National Cardiovascular Center³

再生医療の3要素である細胞、増殖因子、足場材料のうち、足場材料 (Scaffold: スキャフォールド) については工学技術に依存するところが大きい。これまでに、ポリ乳酸系ポリマーをはじめとする生分解性高分子材料によって種々のスキャフォールドが開発されている。また、コラーゲン、ゼラチンなどの天然高分子もその生理活性を目的に応用されている。再生医療用スキャフォールドを直接、患部に埋め込んで組織再生を誘導する、いわゆる *in situ* 型の再生医療は、置換後ただちに機能が発揮されるため、望ましい再生医療の典型である。これに用いられるスキャフォールドは周辺組織と調和する物性と細胞増殖性および分解性を兼ね備える必要がある。合成あるいは天然の高分子材料では、生体組織との物理的特性が一致せず、また、心臓弁などの強靭性を達成することは困難である。我々は、*in situ* 型の再生医療の早期実現のために、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。

脱細胞化組織の調製には、一般的に、界面活性剤を用いて細胞成分を可溶化し、その後大量の洗浄液で洗浄し、残渣を除去する。この場合、界面活性剤の深部への浸潤が困難である、界面活性剤の残存が問題となる、滅菌が困難なためすべての行程を清潔環境で行う必要がある、などの問題点がある。我々はこれらを解決する新しい工学技術として、超高静水圧処理を用いた方法を開発した。以下に研究の一例を示す。

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、ミニブタに同種移植を行い、組織再生を検討した。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。このように、血管や心臓弁などの循環器系の繊維性組織を基盤とする組織再生については、優れた成果があげられている。

超高圧処理による脱細胞化法は、物質の拡散に依存せず全体を一括して処理できるため、種々の組織に応用が可能である。その例として、大腿骨、関節軟骨、腱、および靭帯の脱細胞化にも成功している。この場合には、血管組織とは異なり、圧力や洗浄の条件を最適化する必要があるが、いずれの場合にも、高い効率で細胞除去が可能であった。

脱細胞化組織を用いた再生医療を支える工学技術には、超高圧処理の他に、洗浄の効率を高めるマイクロ波照射洗浄法、細胞成分をより高率に除去するための超臨界流体を用いた洗浄法、再細胞化を行うための細胞ディスペンス装置、および再細胞化を *in vitro* で完成させるためのバイオリアクターなどがあげられる。これらの技術を総合化することにより、安全性の高い再生医療が可能となる。我々は、我が国発の生物組織を用いた再生医療技術の確立を目指しており、この目的の達成のためには幅広い工学技術の結集が必要である。多くの研究者の御協力をお願いする。

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。

バイオリアクターを用いた脱細胞化ブタ大動脈血管への細胞播種

戸川 祐一¹, 江橋 具², 吉田 謙一², 船本 誠一², 西岡 宏²,
大場 謙吉¹, 藤里 俊哉², 中谷 武嗣²

関西大学¹, 国立循環器病センター²

Cell seeding onto acellular porcine aorta using bioreactor

Yuichi Togawa¹, Tomo Ehashi², Ken'ichi Yoshida², Seiichi Funamoto², Hiroshi Nishioka²,

Kenkichi Oba¹, Toshia Fujisato², Takeshi Nakatani²

Kansai University¹

National Cardiovascular Center²

1. 緒言

組織工学的手法を用いた生体組織の再生において、近年様々な種類の細胞の足場となる scaffold が開発されている。我々はブタの大動脈から採取した血管を、超高静水圧印加処理を行うことで脱細胞したものを scaffold として、同種移植を行っている。しかし、一部症例においては狭窄や、石灰化が見られることがあり、それらを解決するためには移植前にレシピエントの血管内皮細胞を播種することが有効と考えられる。その際、バイオリアクターを用いて循環させながら培養することで生体内に近い環境で培養することができると考えられる。本報告では、回転型バイオリアクターによって脱細胞化血管 scaffold への血管内皮細胞の播種について検討するとともに、循環バイオリアクターによる長期培養についても検討した。

2. 実験

クラウン系ミニブタ (ジャパンファーム) から大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理 (神戸製鋼) を行うことで、ドナー細胞を除去した組織を scaffold として用いた。ミニブタの末梢血管からコラゲナーゼ処理にて単離・培養した血管内皮細胞を、scaffold に回転型バイオリアクターによって、播種した。その後、1 日静置状態で培養し、さらに閉鎖回路を用いた循環バイオリアクターで培養を継続した。以前報告した回路では、長期間使用すると回路内に気泡が発生し、遠心ポンプ

の流れを妨げるなどの様々な問題があったため、今回は、エアトラップを組み込む等によって、回路に改良を加えた。

3. 結果と考察

図 1 に回転播種後の大動脈 scaffold のトルイジン染色画像を示した。ミニブタから単離・培養した血管内皮細胞を大動脈に 4 時間回転播種することで、内壁に播種することができた。

図 2 に今回作製した循環バイオリアクターの写真を示した。エアトラップを用いることで、長期間の使用においても、回路内の気泡を除去することができた。現在、長期の培養についても検討している。

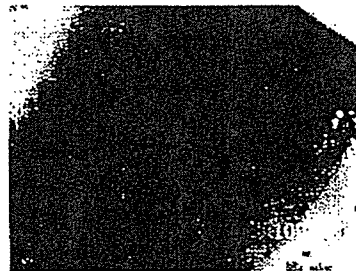


Figure 1. Porcine aorta scaffold endocellularized by rotation bioreactor.

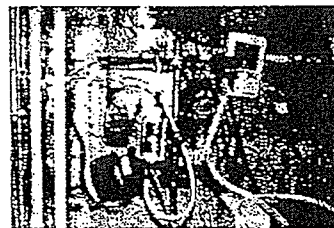


Figure 2. Circulation bioreactor for cell-seeded vascular scaffold.

生体由来コラーゲン製人工血管の開発

寺田 堂彦^{1,2}・澤田 和也³・緒方 裕之²・吉田 謙一⁴・船本 誠一²
 藤里 俊哉²・岸田 晶夫⁵・永谷 憲歳²・中谷 武嗣²・北村 惣一郎²
 医療機器センター¹・国立循環器病センター²
 大阪成蹊短期大学³・先端医療振興財団⁴・東京医科歯科大学⁵

Development of artificial vascular grafts made of biological tissue.

Dohiko Terada^{1,2}, Kazuya Sawada³, Hiroyuki Ogata², Ken'ichi Yoshida⁴, Seiichi Funamoto²,
 Toshia Fujisato², Akio Kishida⁵, Noritoshi Nagaya², Takeshi Nakatani², Soichiro Kitamura²
 Japan Association for the Advancement of Medical Equipment¹, National Cardiovascular Center²,
 Osaka Seikei College³, Foundation for Biomedical Research and Innovation⁴, Tokyo Medical Dental University⁵

緒言

現在、臨床において人工血管は年間約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。再生型人工血管として吸収性材料を用いる研究が行なわれているが、その分解機構は単なる加水分解であるために、持続的に血圧に抗しなければならない動脈系への適応は難しい。また、生体組織特有の柔軟性に欠け、複雑な形状部位への適応も困難である。これらを解決するために、生体血管組織を利用した再生型人工血管の開発について検討を行なった。

実験

架橋剤あるいは熱架橋によっ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、エラスターゼ（エラスチン分解酵素）のトリスバッファー溶液中に浸漬することで、血管組織からエラスチンを分解除去した。得られた試料を、組織学的観察及び力学試験によって評価した。

結果と考察

グルタルアルデヒド (GA) によって固定化された血管組織から、エラスターゼ処理によりエラスチンを除去することが可能であった (図1)。同様に、熱架橋処理された試料からも、エラスチンを除去することが可能であった。いずれの固定化処理も、主にコラーゲン分子同士を架橋して安定化させるが、エラスチン分子にはほとんど作用しないためと考えられる。

GA 固定化処理においては、比較的緩やかな条件で固定化処理された血管組織からは、エラスターゼ処理による組織内細胞の脱核も確認された。熱架橋処理においてもエラスターゼ処理による脱核が認められた。

エラスチンの除去に伴って力学特性は低下したが、固定化処理条件を適切に設定することによって、血管組織として必要な力学特性を保持することが可能であった (図2)。

得られた人工血管は、生体由来コラーゲンを利用するために良好な生体適合性を有し、かつ、血管組織の形状をそ

のままの状態を利用して、複雑な形状部位でも作製可能である。本方法によって、再生型的人工血管を作製できる可能性が示唆された。



Fig. 1 Elastica von Gieson staining for the treated aorta fixed in glutaraldehyde solution (0.01 wt%, 25 °C, 24 h) followed by enzymatic digestion in elastase solution (570 u/L, 37 °C, 12 h). The bar in the figure is corresponding to 200 μ m.

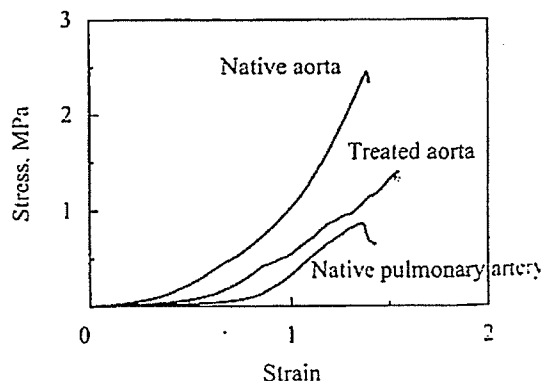


Fig. 2 Stress-strain curves of the native aorta and pulmonary artery and the treated aorta fixed in glutaraldehyde solution (0.01 wt%, 25 °C, 24 h) followed by enzymatic digestion in elastase solution (570 u/L, 37 °C, 12h).

γ線照射による移植用生体組織の開発

国循セ ○藤里俊哉・松本誠一・吉田謙一・山岡哲二・中谷武嗣
 原子力機構 菊池正博・小林泰彦
 東医歯大 木村 剛・岸田晶夫

*先端医療振興財団

【緒言】

現在、我が国において人工心臓弁は年間1万個、人工血管は5万本が使用されている。屍体から提供されるヒト心臓弁や血管も組織バンクを通じて臨床使用されているが、年間数十件程度に過ぎない。米国では商業利用によって、年間数千件のヒト組織が使用されている。人工素材から作成される移植用組織は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。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移植用組織の開発を行っている。

【実験】

マウスやラット、ブタの血管や心臓弁、肺等組織を摘出し、PBS中にてコバルト60を線源とするγ線照射を行った。γ線照射量は、10、30、100、300、1000Gy、吸収線量率は、それぞれ100、300、100、300、1000Gy/hである。照射後、PBSをベースとする洗浄液にて洗浄した。処理後の組織を、光学顕微鏡並びに電子顕微鏡で組織学的に観察するとともに、組織を細切後、組織内に残存しているDNA量を測定することで、細胞除去を評価した。また、力学試験機にて引っ張り試験を行い、破断までの張力を測定することで生体力学特性を評価した。

【結果と考察】

ガンマ線照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存が見られたが、照射線量が増えるにつれて洗浄後組織内の核の残存が減少していた。また、残存DNAを測定したところ、100あるいは300Gy以上の照射では大幅に減少する傾向が見られた。力学特性は、破断強度並びに弾性率とも大きな影響は見られなかった。すなわち、300Gy以上のガンマ線を照射後、洗浄処理することによって、組織内の細胞はほぼ完全に除去できると思われる。細胞除去組織を用いた再生型組織移植技術の臨床応用で先行するドイツや米国のグループは、界面活性剤や酵素液、または低あるいは高張液への浸漬処理によって細胞を除去している。この場合、細胞除去の効率は処理液による浸透性に依存しており、組織深部での細胞除去が困難であると考えられる。また、動物組織由来の場合では、残存成分による拒絶反応の他、動物由来感染症の危険も払拭できない。実際、動物組織由来の米国社製品を移植された患者が死亡する事例も報告されており、細胞除去が不十分であった可能性が指摘されている。これに対し、既に我々が報告している超高静水圧印加や、本報告におけるガンマ線照射による細胞除去では、組織深部への透過性はもちろん、骨や軟骨などの硬組織においても適用可能であると考えられる。

【謝辞】

本研究は文部科学省原子力試験研究費の補助を受けて行われた。

Regenerative tissue scaffolds prepared by gamma ray irradiation.

Toshia FUJISATO¹, Seiichi FUNAMOTO¹, Kenichi YOSHIDA^{1,2}, Tetsuji YAMAOKA¹, Tsuyoshi KIMURA⁴, Masahiro KIKUCHI³, Yasuhiko KOBAYASHI³, Akio KISHIDA⁴, and Takeshi NAKATANI¹ (¹National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2, Minatojima Minamimachi, Chuo, Kobe 650-0047, Japan, ³Japan Atomic Energy Agency, 1233 Watanuki-machi, Takasaki, Gunma 370-1292, Japan, ⁴Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan)

¹Phone: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496 E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

Key Word: tissue engineering / scaffold / γ-ray

Abstract: Tissue-engineered grafts may have the advantage of growth potential and anti-infection compared with the current artificial grafts. Detergents are commonly used for removal of the cells, whereas the decellularization depends on their permeation in the tissue. Novel decellularization process has been developed by a pretreatment of the γ-ray irradiation.

Mouse, rat, and porcine vascular tissues were isolated and irradiated by the γ-ray of 10 to 1000Gy, followed by immersing into PBS-based washing solution. They were then subjected to the histological observation, DNA assay, and biomechanical study.

There were no cells observed in the tissues treated by the γ-ray more than 300Gy. The amount of DNA in the tissue treated was lower than 10% of that in the native tissue. There were no major changes in biomechanical properties after the treatment. This process may be useful for safe acellular grafts for the vascular tissue regeneration.

遺伝子導入能を有する超高压誘起 ナノ無機粒子/高分子/DNA 複合体の調製

東医歯大生材研 ○木村剛・南広祐 岡山大環境理工 六雄伸吾・吉澤秀和
 国循セ研 岡田正弘・古園勉・藤里俊哉 東医歯大生材研 岸田晶夫

<緒言>

我々は超高压状態における物質の水素結合の強調性に着目し、種々の水素結合性高分子を用いた超高压誘起水素結合性高分子集合体による細胞への遺伝子導入について検討している。これまで、ポリビニルアルコール (PVA) /DNA 複合体、および、ハイドロキシアパタイト (HAp) を含有する HAp/PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入を報告してきた。また、高濃度 PVA への超高压印加によりハイドロゲルが形成されることから、PVA/DNA ゲルからの DNA の徐放についても取り組んでいる。本研究では、PVA/DNA ゲルに HAp を含有させることで細胞接着性を付与し、接着する細胞への効率的な遺伝子導入について検討した。

<実験>

重合度 1700、鹸化度 99.3%の PVA を用いた。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 (50~400nm) の HAp を得た。また、異なる結晶化度の HAp も調整した。遺伝子としては、蛍光タンパク質遺伝子を有する pEGFP プラスミド DNA、サケ白子 DNA を用いた。5、7.5、10w/v% の PVA 水溶液を調製し、0.01~10mg/ml の HAp 溶液、DNA 溶液と種々の割合で混合し、10000 気圧、10 分間加圧した (超高压処理)。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)、マウス骨髄細胞、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。

<結果・考察>

PVA/HAp/DNA 混合液への超高压処理により白色のハイドロゲルが得られた。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。SEM 観察では、ハイドロゲル表面に HAp が観察され、また、DNA 染色法により DNA の含有が確認された。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。PVA ゲル上では細胞接着は観察されず、HAp 含有 PVA ゲルにおいて有意な細胞接着が認められた。遺伝子導入についても報告する。

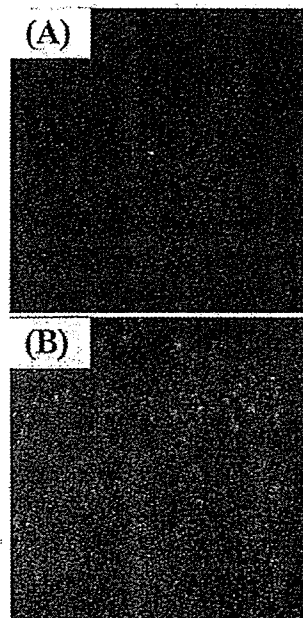


Fig. Adhesion of L929 cells on (A) PVA/DNA and (B) PVA/HAp/DNA hydrogels.

Preparation of nano-inorganic particle/polymer/DNA composites by ultra high pressure technology for gene transfection

Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIZAWA², Masahiro OKADA³, Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISAO³, Akiyo KISHIDA¹ (¹Tokyo Medical and Dental Univ., 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, ²Okayama Univ., ³National Cardiovascular Center Research Institute)

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

Key Word: ultra high pressure treatment / hydrogel / transfection / hydroxy apatite

Abstract: We have performed the development of nano-inorganic particle/polymer/DNA composites by ultra high pressure technology for gene transfection. Nano scaled hydroxy apatite (HAp) was used as nano-inorganic particle. Polyvinyl alcohol (PVA, 5, 7.5, 10w/v%) aqueous solution mixed with HAp(0.01-10mg/ml) and DNA, then treated by ultra high pressure at 10,000 atm for 10min. HAp/PVA/DNA hydrogel was obtained. By SEM observation, HAp particles on the surface of the hydrogel were observed. By DNA staining, the including of DNA in the hydrogel was confirmed. In order to investigate the cell affinity of the hydrogel, various cell lines were added on the hydrogels. In the case of PVA/DNA hydrogel, almost all of cells were not adhered. On the other hand, the effective cell adhesion was observed on HAp/PVA/DNA hydrogel.

エンドソーム遊離促進を目指した
ナノHAp/PVA/DNA複合体による遺伝子導入

東医歯大生材研 ○仁部洋一・木村剛・南広祐 岡山大環境理工 六雄伸吾・吉澤秀和
国循セ研 岡田正弘・古菌勉・藤里俊哉 東医歯大生材研 岸田晶夫

【緒言】我々は、超高压処理により調製したポリビニルアルコール (PVA) と DNA の複合体を用いた細胞への遺伝子導入を検討している。PVA/DNA 複合体の細胞内送達は達成されたが、十分な遺伝子発現は認められなかった。そこで、エンドソームの遊離促進を目指し、低 pH で溶解されるハイドロキシアパタイトのナノ粒子を含有するナノ HAp/PVA/DNA 複合体を考案し、遺伝子導入効率の向上が示された。本研究では、更なるエンドソーム遊離促進と遺伝子導入効率の向上を目指し、物性の異なる HAp を用いた HAp/PVA/DNA 複合体による遺伝子送達について検討した。

【実験】形状および酸溶解性の異なる HAp を用いた、HAp 濃度、分散処理条件の最適化を行い、超高压処理装置 (Dr.CHEF; (株)神戸製鋼所) を用いて 37°C、10000atm の超高压処理を施し、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体を得た。得られた複合体の物性を光学・電子顕微鏡観察、DSC 測定にて解析した。COS7 細胞への遺伝子送達について、蛍光ラベル化したプラスミド DNA を用いて検討した。

【結果と考察】超音波処理を 20 分した後、高濃度 DNA 溶液に混合した場合に高分散性複合体が得られることが明らかとなった。得られた DNA/PVA/HAp 複合体の SEM 観察では、表面および内部への HAp 含有が確認された。蛍光ラベル化 DNA を用いた細胞内送達では、添加後 1 時間において HAp を含有しない PVA/DNA 複合体、リン酸カルシウム/DNA 複合体に比べ、HAp/PVA/DNA 複合体の場合に有意な細胞内導入が達成された。24 時間後においても導入遺伝子は確認された (図)。これらの結果より、HAp による早期の細胞内送達を示された。

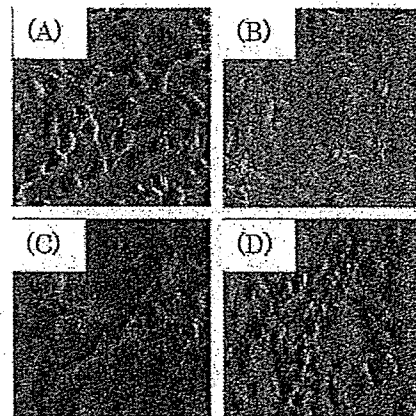


Fig. Gene delivery into COS7 cells using (A) DNA, (B) nano-PVA/DNA (C) nano-HAp/PVA/DNA complex and (D) calcium phosphate/DNA complex.

Gene delivery using nano-HAP/PVA/DNA complexes promoting endosomal escape

Yoichi NIBE¹, Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIZAWA², Masahiro Okada³, Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISATO³, Akio KISHIDA¹
(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ²Okayama University, ³National Cardiovascular Center Research Institute)

Phone&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: We have researched gene transfection using hydrogen bonding polymer/DNA complex prepared by ultra high pressure technology. In this study, for effective gene transfection, we investigated the preparation of nano-hydroxyl apatite (HAp)/PVA/DNA complex including nano-scaled HAp particles promoting endosomal escape. Gene transfection was carried out using fluorescent labeled plasmid DNA molecules. After 1hour incubation, the effective cellular uptake of HAp/PVA/DNA complexes comparison with PVA/DNA complex and DNA was observed by fluorescent microscope, and then high transfection efficiency was achieved using HAp/PVA/DNA complexes. These results indicate the effective DNA release from endocytosis.

PEG/多糖の水相二相系への超高压処理による新規構造体の調製

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

<緒言>

我々は超高压技術を用いた新規構造体の創製について研究を行っている。超高压条件下では、水素結合が強調されることに着目し、これまで、水素結合性高分子であるポリビニルアルコール(PVA)への超高压印加により、ナノ・マイクロ粒子、ハイドロゲルが形成されることを報告した。本研究では、種々の分子量の PEG/多糖水性二相系の高分子混合液への超高压処理による、新しい多成分系ポリマー構造体の調製について検討した。

<実験>

種々の分子量のポリエチレングリコール(PEG, Mw:6000, 8000)、デキストラン(DEX, Mw:60,000~90,000, 50,000)、プルランを用いた。各々10%(w/v)水溶液を調製し、1:1の割合で混合した後、25°Cで10,000気圧、10分間超高压印加処理した。処理液を、目視による観察、動的光散乱(DLS)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。

<結果・考察>

各単成分溶液への超高压処理では、目視による変化が確認できなかった。一方、PEG/DEX混合溶液では、溶液を調製した段階で溶液が青白色を呈した。これは、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 を混合することにより水性二相分離が形成されることが知られている。今回用いた PEG、DEX は低分子量であることから二相は形成されず、エマルジョンな状態となったことで散乱が生じ、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処理では、高分子量の DEX を用いた場合に水性二相を形成し、下相では青白色を呈した(図1)。より高分子量の DEX (Mw=500,000)を用いると、超高压を印加しない場合でも水性二相を形成するが、処理後では変化は確認できなかった。従って、この現象は超高压による PEG と DEX から成る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。生じた二相分離の下相部の溶液の DLS 測定(25°C)では、いずれの場合も粒子径の増加が観察された。また、50°Cにおける DLS 測定では粒子径の減少が示されたから、PEG/DEX のエマルジョンへの超高压印加処理により、水素結合を介した新規多成分構造体が形成されたと考えられる。また、PEG/プルラン混合系においても、同様の結果が得られた。PEG/DEX 構造体の詳細な解析、および超高压処理によるその他の PEG/多糖構造体についても報告する。厚生労働省科学研究費ならびに文部科学研究費の補助を受けて行われた。

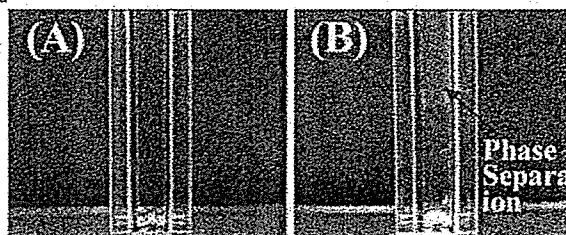


Fig1. Photographs of the mixtures of PEG(6,000) and DEX(60,000~90,000).

(A) without or (B) with ultra high pressure treatment.

Preparation of novel structures by ultra high pressure treatment for aqueous PEG/polysaccharides two-phase system

Yoshivuki MIURA¹, Kimio KURITA¹, Tsuyoshi KIMURA², Kwangwoo NAM², Shingo MUTSUO³, Hidekazu YOSHIZAWA³, Masahiro OKADA⁴, Tsutomu FURUZONO⁴, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA^{2,1}(Nihon Univ., 1-8-14 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan,²Tokyo Medical and Dental Univ.,³Okayama Univ.,⁴National Cardiovascular Center Research Institute)

² TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra high pressure treatment / aqueous two-phase system

Abstract: In this study, the preparation of novel structures by ultra high pressure (UHP) treatment for aqueous PEG/polysaccharides two-phase system was investigated. For polyethylene glycol (PEG) or dextran (DEX) solutions, the clear solutions were maintained after UHP treatment. On the other hand, when PEG (Mw: 6,000 or 8,000) were mixed with DEX (Mw:60,000-90,000) or pullulan, the solution with light scattering was obtained. After UHP treatment, aqueous two-phase separation having light scattering in lower phase was obtained for all cases, suggesting that apparent molecular weight was increased by the formation of PEG/ polysaccharides complex. DLS measurement of them before/after UHP treatment was carried out. The particle size was increased by UHP treatment, then decreased by heat treatment at 50 degrees, indicating the formation of novel hydrogen bonding structures.