

Each of the acellular aortae with and without alcohol treatment was transplanted to the allogeneic miniature pig orthotopically. The animals transplanted were sacrificed after 3 or 6 months and the explanted grafts were subject to the histological study for determination of the host cell infiltration and calcification.

The amounts of phospholipids were 8.5, 7.1, and less than 0.5 mg/wet g in the native aorta, acellular aorta without alcohol treatment, and acellular aorta with alcohol treatment, respectively. The grafts treated were completely cell free in HE staining. There was no dilatation and no aneurysmal change observed in all cases after the transplantation. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by the host cells after 3 months in both cases. There were several calcium deposits observed along to elastic fibrils in a middle region of the acellular graft without alcohol treatment after 6 months. However, there were few deposits observed in the graft with alcohol treatment. The residual phospholipids may cause calcification in acellular aortic transplantation.

P169

### Isolation and characterization of goat endothelial progenitor cells

R.T. Haverslag, N.E. Federovich, J. Alblas, W.J.A. Dhert

University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands

The limited diffusion of nutrients and waste products impairs current development of large bone constructs. Encapsulation of endothelial progenitor cells (EPCs) in tissue engineered constructs is opted as a promising approach to significantly enhance vascularization and thus graft survival (Wu et al., 2004). The goat is an important animal model in bone tissue engineering and the encapsulation of goat EPCs could be decisive in the construction of vascularized bone scaffolds. Therefore we isolated and characterized goat EPCs peripheral blood and bone marrow.

The mononuclear cell fractions of both peripheral blood and bone marrow were isolated using a Ficoll density gradient and subsequently cultured in M199 medium or in EGM-2 medium, supplemented with 5 or 20 % fetal bovine serum (Rumpold et al., 2004). Early or late outgrowth cells were analyzed by immunocytochemistry for several endothelial markers: uptake of acetylated LDL; binding of isolectin B4 and anti-von Willebrand Factor (vWF). PECAM-1 (CD31) expression was analyzed using Western Blot and FACS analysis. Tubule formation was evaluated using an in vitro angiogenesis assay.

Peripheral blood-derived EPCs did not proliferate substantially when cultured in M199 whereas bone marrow-derived EPCs did. Both peripheral blood- and bone marrow-derived EPCs were positive for uptake of acetylated LDL and binding of Isolectin B4 after 4 days. After 35 days of culture in M199, only a fraction of the bone marrow-derived EPCs were positive for vWF and PECAM-1. Also, bone marrow-derived EPCs migrated to form cell clusters in the angiogenesis assay.

When peripheral blood-derived EPCs were cultured in EGM-2, they did show efficient outgrowth and they were positive for uptake of acetylated LDL, isolectin B4 binding and PECAM-1 expression.

In conclusion, we could highly efficiently isolate goat EPCs from peripheral blood in culture medium already optimized for endothelial cell propagation (EGM-2). These late outgrowth cells appeared frequently, proliferated fast and showed endothelial markers as early as 7 days after isolation. The late endothelial marker PECAM-1 could be detected after 14 days of culture. EPCs cultured in M199 or isolated from bone marrow were less frequently found but also showed expression of endothelial markers, as well as formation of cell clusters in Matrigel.

We will use these EPCs in co-culture studies with goat mesenchymal stem cells in order to evaluate their effect on osteoblast differentiation.

#### References:

- Wu et al., (2004). *Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287: H480H487.  
Rumpold et al. (2004). *Endothelial progenitor cells: A source for therapeutic vasculogenesis?* *J. Cell. Mol. Med.* 8:509-518.

P170

### Micromechanical modeling of the scaffold-new formed bone systems

W. Swieszkowski<sup>1</sup>, C. Hellmich<sup>2</sup>, V.S. Komlev<sup>3</sup>, F. Rustichelli<sup>3</sup>, R. Cancedda<sup>4</sup>, K.J. Kurzydowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Vienna University of Technology, Vienna, Austria

<sup>3</sup>Politecnico Università delle Marche, Ancona, Italy

<sup>4</sup>Università di Genova, Genova, Italy

The challenge of bone-tissue engineering is to design a cell seeded scaffold allowing for the new tissue formation in vivo. Calcium phosphate-based materials have been widely investigated for use as bone scaffold materials. In the present study, the two bone scaffolds with 60 % porosity have been made of synthetic hydroxyapatite (Fin-Ceramica, Italy), then loaded with in vitro-expanded BMSCs and subcutaneously implanted in immunodeficient mice. The scaffolds were harvested after 8 and 24 weeks and examined using X-ray computed microtomography at the ESRF - synchrotron radiation facility in Grenoble.

再生医療・脱細胞

G-099 マイクロ波と拍動循環を駆使した無細胞化技術による再生促進型大動脈弁

早稲田大学生命医療工学研究所<sup>1)</sup>, Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School<sup>2)</sup>, 東邦大学大橋病院心臓血管外科<sup>3)</sup>, 早稲田大学大学院生命理工学専攻<sup>4)</sup>

岩崎 清隆<sup>1), 2)</sup>, 尾崎 重之<sup>3)</sup>, 川井 貴裕<sup>4)</sup>, 山口 晋平<sup>4)</sup>, 江藤 元治<sup>4)</sup>, 大庭 幸裕<sup>4)</sup>, 大関 泰宏<sup>3)</sup>, 島ノ内 正起<sup>3)</sup>, 梅津 光生<sup>4)</sup>

【緒言】我々はマイクロ波と拍動循環技術を駆使して、組織及び臓器から拒絶反応を呈す細胞を除去する装置を開発し、大動脈弁、動脈血管の脱細胞化に成功している。既に、我々の処理ではこれまで困難であった大動脈弁・血管といった弾性繊維が密な組織からも細胞核を除去できることを組織染色像から示し、かつ細胞外マトリクスの形態は保存されることを報告している。また、弾性率や破断強度に影響を与えず、強度、耐久性が要求される左心系組織への応用には有望な結果を得ており、昨年には、ブタからヒトへの異種移植で大きな課題である強烈な超急性拒絶反応を引き起こす $\alpha$ 1,3ガラクトース抗原を除去できることを証明した。ここでは、脱細胞化した大動脈弁について組織安全性などを詳細に調べ、また動物実験の現況について報告する。【方法】2.45GHzのマイクロ波を照射し拍動させながら脱細胞化を行う独自開発装置により、ブタ大動脈弁等を処理した。組織残存DNA量、及びブタ内在性レトロウイルスの有無の検討を行い、合わせてブタ下行大動脈への移植実験も行った。【結果及び考察】組織中の残存DNA量を調べた結果、処理した大動脈弁、動脈血管、肺動脈弁、心臓からはDNAが全く検出されなかった。さらに、PCR法によりブタ内在性レトロウイルスの有無を調べた結果、レトロウイルスは検出されなかった。DNAが無く、糖鎖抗原も無く、レトロウイルスも無い組織を創生する我々の処理技術は、再生医療用足場としてブタ由来組織を使うことを視野に入れる際の大きな課題であった安全性という問題に対して、1つのブレークスルーを行えたと考えられた。下行大動脈への移植実験から、無細胞化した大動脈弁は6ヶ月間問題なく機能し、無細胞化した弁はin vivoでレシピエントの細胞で高度に再構築・再生されることが明らかとなった。【結語】これまで、他の研究報告や臨床応用されている肺動脈弁でもDNAが処理後に数%残ることが報告されており、DNAの無い完全無細胞化弁の報告はない。我々の処理法は、この点で世界で初めて完全に無細胞化を行え、大動脈弁の下行大動脈への6ヶ月の移植データから自己細胞で再構築・再生されることが確認された。

G-100 種々の超高静水圧印加条件にて調製した脱細胞化血管の特性検討

東京医科歯科大学生体材料工学研究所<sup>1)</sup>, 国立循環器病センター研究所先進医工学センター再生医療部<sup>2)</sup>

村越 彩子<sup>1)</sup>, 木村 剛<sup>1)</sup>, 南 広祐<sup>1)</sup>, 松本 誠一<sup>1)</sup>, 藤里 俊哉<sup>2)</sup>, 岸田 晶夫<sup>1)</sup>

【緒言】再生医療における細胞の足場材料として、生分解性高分子、セラミックス、生体由来材料などが用いられている。これらに加えて、最近、生体組織から細胞を除去し、残存するマトリックスを足場とする方法(脱細胞化組織)の導入が検討されている。細胞除去法としては、界面活性剤や酵素などの化学的処理が主流であるが、化合物の残存が問題として残る。そこで我々は、物理的な脱細胞化法として超高静水圧処理法を開発し、血管・弁の脱細胞化について検討してきた。本研究では、種々の超高静水圧処理条件により得られる脱細胞化血管の特性について検討した。【方法】成体ブタ大動脈片(10×10mm)を作製し、超高圧処理装置を用いて、種々の圧力印加条件にて超高静水圧印加処理を施した。具体的には、処理温度を10、15、20、25、30℃とし、666、1000、2000気圧/分の昇圧速度にて昇圧後、10,000気圧下で10分間保持し、同速度にて減圧した。種々の期間の洗浄操作により細胞残渣を除去した。ヘマトキシリン-エオジン染色、TEM観察、DNA定量にて脱細胞化を検討し、引張試験、ラット皮下埋入試験による物性、生体適合性などの脱細胞化血管の特性を評価した。【結果と考察】血管の脱細胞化は洗浄期間に依存し、長時間の洗浄によりほぼ完全な脱細胞が達成された。血管の構造・構造変性は圧力印加条件により異なり、10℃、2000気圧/分条件の場合にはコラーゲン繊維間の拡張が観察されたが、666気圧/分の場合には構造の維持が示された。前者の場合、圧力印加時に系内温度が約30℃変化するに対して、後者は約7℃の変化に留まる。この圧力変化に伴う温度変化の抑制により、組織内水分の急激な凝固・融解が抑制されたため、構造維持がなされたと考えられる。脱細胞化血管の生体適合性は、未処理の血管に近似し、界面活性剤(TritonX100)を利用した脱細胞法とは異なる結果であった。ラット皮下埋入試験においては、脱細胞血管の有意な炎症反応抑制が示された。本研究は、厚生労働省科学研究費ならびにヒューマンサイエンス振興財団の補助を受けて行われた。

再生医療・Scaffold

G-101 リン脂質ポリマーで修飾した脱細胞化血管組織作製

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

南 広祐<sup>1,2)</sup>, 木村 剛<sup>1)</sup>, 村越 彩子<sup>1)</sup>, 藤里 俊哉<sup>2)</sup>, 岸田 晶夫<sup>1,2)</sup>

【目的】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行われている。本研究では優れた血液適合性を示す2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを脱細胞化血管組織に直接固定化したリン脂質ポリマー修飾血管組織を作製し、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】超高压で脱細胞化した血管組織をcarbodiimide(EDC)とN-hydroxysuccinimideを含有するバッファー中に浸漬し、架橋させ、EDC/NHS架橋血管組織を得た(EVat)。MPCポリマーをEN血管と架橋させるため、poly(MPC-co-methacrylic acid)(PMA)選択し、EVatを加え48時間反応させMPCと架橋されたMPC修飾血管組織(MiVat)を得た。さらにPMAの固定化過程を再度行いMPCの含有率の高いMPC修飾血管組織(MdVat)を得た。脱細胞化した血管組織、EVat、MiVat、MdVatの物理的特性を検討し、PMAの固定による血管組織の特性変化を評価した。さらに、フィブリノゲンの吸着実験と細胞接着実験により生物的特性を検討した。【成績】膨潤実験の結果、架橋により膨潤度の減少が確認された。その結果、MPC修飾より強度増加が観察された。これはPMAによってコラーゲン繊維間の架橋により、力学的物性が増加と考えられる。コラーゲナーゼによる分解は架橋により抑制されることが分かった。接触角測定の結果、架橋による接触角の低下が確認された。これはPMAの導入による表面の親水性化を示している。PMA濃度の増加とともに接着したフィブリノゲンと細胞の数が減少した。これは表面でのMPCの密度の増加により表面が親水性化し、フィブリノゲンと細胞の接着を抑制したと考えられる。【結論】PMAとコラーゲン間架橋技術を使い、たんぱく質と細胞の接着を抑制する強いPMA固定化血管組織を作製に成功した。【謝辞】本研究の一部は、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。

G-102 エレクトロスピンニング法を用いたセグメント化ポリウレタンScaffoldの作製

東京電機大学大学院理工学研究科電子情報工学専攻<sup>1)</sup>, 東京電機大学理工学部電子情報工学科<sup>2)</sup>, 東京電機大学フロンティア共同研究センター<sup>3)</sup>, 杏林大学保健学部臨床工学科<sup>4)</sup>, 津田沼中央総合病院<sup>5)</sup>, 横浜市立大学<sup>6)</sup>

野中 一洋<sup>1)</sup>, 矢口 俊之<sup>2)</sup>, 舟久保 昭夫<sup>2)</sup>, 岩淵 悠一郎<sup>1)</sup>, 住倉 博仁<sup>3)</sup>, 福長 一義<sup>4)</sup>, 大越 隆文<sup>5)</sup>, 野一色 泰晴<sup>6)</sup>, 福井 康裕<sup>2)</sup>

【目的】高分子材料を用いたScaffold(足場)は組織工学、再生医療の分野に広く応用されている。細胞はナノ、マイクロスケールの微細な構造物に寄り添うようにして移動、分裂増殖する接触走性と呼ばれる本能的性質を備えており、最適なScaffold構造を明らかにするためには、繊維直径、空隙率などに対する細胞挙動の詳細な評価が重要である。微細繊維を作製する方法として高分子溶液に高電圧を印加し、電気的に繊維を紡糸するエレクトロスピンニング法が挙げられる。本研究ではセグメント化ポリウレタン(Segmented Polyurethane: SPU)を用いて繊維性Scaffoldを作製し、試作条件と繊維径形成の関連性について検討を行った。【方法】SPUをテトラヒドロフラン(Tetrahydrofuran: THF)とN,N-ジメチルホルムアミド(N,N-dimethylformamide: DMF)の溶媒を用いて溶解し、混合比(THF/DMF,80/20(v/v))の割合でSPU溶液を調合した。エレクトロスピンニング法により、溶液濃度14.5[w%],印加電圧12.5[kV],噴射距離12[cm]一定の条件下でシリンジポンプ押し出し速度を0.02~0.3[mm/min]の範囲内で変化させScaffoldシートを作製した。Scaffoldシートは走査型電子顕微鏡(Scanning electron microscope: SEM)を用いて表面の画像を取得し、無作為に35箇所繊維径を測定し、その平均値と標準偏差値を算出した。【結果】シリンジポンプ押し出し速度が0.02,0.15,0.2,0.25,0.3[mm/min]の条件において繊維径 $1.56 \pm 0.24, 2.38 \pm 0.28, 3.67 \pm 0.60, 4.49 \pm 0.44, 5.18 \pm 0.50$ [ $\mu$ m]のほぼ均一な繊維径が得られた。また作製したScaffoldの断面画像をSEMにより観察した結果、繊維が3次元的に積層していることが確認された。【結論】噴射溶液流量が増加するに従い、繊維径が大きくなる傾向が確認された。このことより、シリンジポンプ押し出し速度を制御することにより、任意の繊維径を備えたScaffoldの作製が可能であると示唆された。

再生医療・マトリックス

G-115 コバルト60による $\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理

東京医科歯科大学生体材料工学研究所<sup>1)</sup>, 国立循環器病センター<sup>2)</sup>, 日本原子力研究開発機構<sup>3)</sup>

松本 誠一<sup>1)</sup>, 江橋 具<sup>2)</sup>, 菊池 正博<sup>3)</sup>, 小林 泰彦<sup>3)</sup>, 山岡 哲二<sup>2)</sup>, 岸田 晶夫<sup>1)</sup>, 藤里 俊哉<sup>2)</sup>, 中谷 武嗣<sup>2)</sup>

【緒言】我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心膜、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きた。脱細胞化組織は、臨床で不足している移植用組織や、テーラーメイド型医療において幹細胞等の患者由来細胞を組み込むための生体スキャフォールドとしての利用が考えられる。これまで、独自技術として超高压印加処理を用いた脱細胞化方法について報告を行ってきた。超高压処理技術が食品加工技術である一方、食品保存に使用されている $\gamma$ 線照射は、線量により組織破壊を伴わない滅菌やウイルスの破壊も行うことできる。そこで細胞への傷害も期待できるもとして、 $\gamma$ 線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理を検討した。【実験方法】脱細胞化処理方法は、脱細胞化組織として摘出してきた食用ブタあるいはミニブタ大動脈をPBSに浸漬し、10 Gyから1000 Gyの範囲で $\gamma$ 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HE染色で観察するとともに、組織内残留DNA量の測定を行った。また、照射線量による組織の力学特性への影響を、力学試験機を用いて調べた。さらに、処理後の脱細胞化組織をラット皮下に移植し、2週間後に取り出してHE染色やCD68抗体を用いた免疫染色により組織学的に検討した。【結果・考察】HE染色の結果、 $\gamma$ 線未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、組織の $\gamma$ 線照射線量が増えるにつれて組織内の核の数が減少していた。組織内残留DNA量も、100 Gy以上では大幅に減少する傾向が見られた。また、 $\gamma$ 線を用いた脱細胞化組織の力学特性には変化は見られなかった。さらに、移植後2週間の組織のCD68染色の結果、未処理組織では組織内部にCD68陽性細胞が多く見られたのに対し、脱細胞化組織においてはCD68陽性細胞が減少しており特に300 Gyと1000 Gyのものでは組織内部の炎症が大幅に抑制されていた。これらのことからコバルト60による $\gamma$ 線を用いた脱細胞化処理方法は生体スキャフォールド作製に有効であると示唆された。

G-116 生体内に酷似したバイオリアクターシステムによる強度のある3層血管の創生

Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School<sup>1)</sup>, 早稲田大学生命医療工学研究所<sup>2)</sup>, 早稲田大学大学院生命理工学専攻<sup>3)</sup>

岩崎 清隆<sup>1), 2)</sup>, 小島 宏司<sup>1)</sup>, 小玉 正太<sup>1)</sup>, Paz Christina<sup>1)</sup>, 海津 光生<sup>3)</sup>, Vacanti Charles<sup>1)</sup>

【緒言】血管のTissue Engineeringについては世界的に多くの研究がなされているが、動脈系に長期耐えうる臨床用組織工学血管は開発されていない。我々は、生体内と酷似した血圧・血流及びpHや炭酸ガス濃度を調整可能な生理的拍動バイオリアクターシステムを開発し、細胞、分解吸収性高分子、及びバイオリアクターを駆使し、冠動脈バイパスやシャント用等に应用可能な血管の創生を目指している。【方法】ウシ動脈血管から内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞をそれぞれ採取・初代培養した。Non-wovenポリグリコール酸及びポリエカプロラクタンの平面状分解吸収性高分子に平滑筋細胞を播種して2日～1週間の平面培養後、外径6mmのチューブに巻き付けさらに2～4週間振盪培養した。その後、線維芽細胞を播種して2日間培養した平面状ポリグリコール酸を外側に巻き付けチューブからはずして血管マウントチャンバに取り付け、内腔に血管内皮細胞混濁培養液を注入し12時間インキュベータで静置した。そして、開発した拍動バイオリアクターシステムに組み込み、1週間～19日間、pH7.4、炭酸ガス濃度5%、拍動数70BPM、平均圧力20, 70, 100mmHgで脈圧が $\pm 20$ mmHg程度、流量0.4～0.6L/minのような生体代替環境で拍動培養を行った。【結果及び考察】創った血管を走査型電子顕微鏡で観察した結果、全腔が内皮細胞で覆われていた。また、組織染色像から、平滑筋細胞層が観察され、3層血管が創生できていることが明らかとなった。また引張試験を行った結果、足場の分解性高分子のみでは血管とは異なる応力-ひずみ特性であったが、バイオリアクターを使って創ったEngineered血管はすべて本来の血管と同様の応力-ひずみ特性へ変化することが判明した。さらに、19日間動脈環境で拍動培養した血管の弾性率及び破断強度はウシの動脈血管とほぼ同程度の強度特性を有するまでになることが明らかとなった。【結語】生理的圧力、流量、pH及び炭酸ガス濃度の環境下で拍動培養可能なバイオリアクターシステムを駆使し、動脈血管と同程度の機械的特性を有する3層血管をin vitroで創生することに成功した。今後、動物実験により、長期耐久性を検討していく。

## G-117 脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長培養

国立循環器病センター研究所再生医療部<sup>1)</sup>, 東京医科歯科大学<sup>2)</sup>, 先端医療振興財団<sup>3)</sup>, 国立循環器病センター臓器移植部<sup>4)</sup>

江橋 具<sup>1)</sup>, 鎌田 和加子<sup>1)</sup>, 船本 誠一<sup>2)</sup>, 吉田 謙一<sup>3)</sup>, 岸田 晶夫<sup>2)</sup>, 中谷 武嗣<sup>4)</sup>, 永谷 憲哉<sup>1)</sup>, 藤里 俊哉<sup>1)</sup>

【緒言】腫瘍切除や事故による組織の損失や、筋ジストロフィー症などの筋疾患による、筋組織の退縮・機能低下に対する外科的治療として、患者自身の健常組織の移植や細胞移植などが行われている。しかし、これらの治療法を用いても筋組織機能の完全な回復は困難で、患者のQOLも著しく低下する。そこで本研究は、移植用の筋組織を生体外で再構築することを目的として、脱細胞化筋スキャフォールドを用いた再生型筋組織の作製の基礎的検討を行った。【実験方法】組織構築のための細胞の足場となる脱細胞化筋スキャフォールドは、食用ブタの骨格筋組織から、超高静水圧印加法を含む脱細胞化処理により作製した。細胞は、未成熟筋細胞である筋芽細胞あるいは骨髄由来間葉系幹細胞を用い、これらの細胞を、遠心操作や注射器を用いた方法で脱細胞化筋スキャフォールドに播種したのち、三次元培養を行った。このとき、通常の静置培養に加えて、細胞を播種したスキャフォールドを伸展培養装置に装着し、全体を20%まで伸長させる、あるいは伸長-弛緩を繰り返す培養を行い、三次元培養やスキャフォールドの伸長が、細胞の増殖や筋細胞への分化に及ぼす影響について検討した。【結果と考察】作製した脱細胞化筋スキャフォールドの組織学的観察とDNA量の計測から、スキャフォールド内の細胞核は完全に脱化されていることが確認された。脱細胞化筋スキャフォールドへの細胞の播種では、遠心操作や注射器を用いるいずれの方法でも、細胞をスキャフォールド内部にまで播種することができた。細胞播種後24時間静置して細胞を接着させたのち、スキャフォールドを伸長のみ、あるいは伸長-弛緩を一定周期で繰り返す培養を3日間行った結果、細胞の形態は通常の静置培養を行った場合よりも、伸長方向に細長く伸展していたことから、増殖や分化活性が高まる可能性が考えられた。以上の結果から、脱細胞化筋スキャフォールドを用いる筋芽細胞の伸長あるいは伸長-弛緩培養により未成熟な細胞を増殖・分化させて、生体外における再生型筋組織構築の可能性が示唆された。

## G-118 組織再生用スキャフォールドのための生分解性薄膜からなる人工毛細血管デバイスの開発

名古屋大学大学院工学研究科

池内 真志, 生田 幸士

【目的】生体外で厚い組織を再生するには、スキャフォールド内部の微小循環が不可欠である。この問題に対し、我々は「人工毛細血管デバイス」を用いた新たなスキャフォールド構造を提案している。人工毛細血管デバイスとは、生分解性樹脂の薄膜で作製されたシート状の微小流路ネットワークである。流路壁の厚さは数 $\mu\text{m}$ で、表面には多数の $1\mu\text{m}$ オーダーの微細孔を有する。そのため、細胞は流路壁面に保持されるが、ガスや培地成分は流路内外を透過できる。この人工毛細血管デバイスと、細胞の層を交互に重ねることにより、スキャフォールド内部の微小循環系を構築し、従来、不可能であった厚い組織を再生することを目指している。本研究では、新たに開発した微細加工法を用いて、人工毛細血管デバイスを作製し、その機能を検証した。

【方法及び結果】人工毛細血管デバイスを作製するために、新原理の微細加工法MeME(Membrane Micro Embossing)を開発した。この手法では、薄膜からなる自由な立体構造を数 $\mu\text{m}$ の分解能で作製することができる。デバイスの材料として、直径 $1\mu\text{m}$ 程度の微細孔を有する多孔質ポリ乳酸薄膜(厚さ $5\mu\text{m}$ )を相分離法により作製した。MeME法を用いて、この多孔質ポリ乳酸薄膜からなる、内径 $50\mu\text{m}$ の微小流路のネットワークを作製することに成功した。流路壁の透過性を検証するため、直径 $0.1\sim 15\mu\text{m}$ のビーズの懸濁液を流路外側から滴下した。その結果、 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子は流路壁を透過し、それ以上の直径を持つ粒子は、流路壁の表面で保持されることを確認した。これは、流路壁上に細胞が保持され、かつ、培地成分は流路壁を透過することを示している。さらに、この流路表面をカラーゲンで修飾した後、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を培養した結果、一般的な培養容器と同等の細胞密度と増殖率を得た。

【結論】本研究では、新原理のMeME法を用いて、人工毛細血管デバイスの作製が可能であることを示した。さらに、作製したデバイスが、スキャフォールド内の微小循環系に求められるサイズ選択的透過性と細胞培養適合性を有することを実証した。今後、この人工毛細血管デバイスを積層し、厚い組織の培養への有効性を検証する。

G-119 脱細胞化による新しい動脈グラフトの開発; プタ同種移植実験における石灰化軽減のための方策

国立循環器病センター研究所

湊谷 謙司, 藤里 俊哉, 吉田 謙一, 船本 誠一, 中谷 武嗣, 北村 惣一郎

【目的】我々は同種あるいは異種生体組織からドナー由来細胞を除去した, 脱細胞化生体スキャフォールドを用いた再生型移植組織の開発を行ってきた。これまで脱細胞した下行大動脈の同所同種移植を行ってきたが, スキャフォールドへの自己細胞の浸潤を認めるものの, 血管壁内部での石灰化の所見を認めた。石灰化の原因として脱細胞化過程の問題とスキャフォールドの壁厚が考えられた。そこで本報では, 1) 洗浄法を変えた脱細胞化処理2) 壁厚の薄い肺動脈を下行大動脈位に移植した実験について検討した。【方法】ドナーとなるクラウン系ミニプタから麻酔清潔下にて下行大動脈, 肺動脈を採取した。冷間等方圧加圧装置を用いた超高压印加処理を行い, 以前に使用していた界面活性剤を中止しエタノールを加えた洗浄処理を行うことでドナー由来細胞を除去した。処理後の組織を, 組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。同種ミニプタをレシピエントとして用い, 左側臥位第4肋間開胸, 下行大動脈単純遮断下に, 脱細胞化した下行大動脈と肺動脈を移植した。移植3ヶ月後に移植組織を摘出し, 肉眼的, 組織学的に評価した。【結果】処理後の組織内では細胞核は全く染色されず, 血管内腔面では内皮細胞が完全に剥離していた。透過電顕の所見からも, 平滑筋細胞の細胞膜や小器官の消失, 核の変性が確認された。コラーゲン繊維及びエラスチン繊維には若干の走行の乱れが認められたが, 左心系である下行大動脈置換術においても破断等の所見は認められなかった。また細胞質のdebrisも以前の処理法に比べてほとんど認められなかった。摘出されたグラフトに肉眼的には異常は認められず, 吻合部にも問題は認められなかった。血管内腔面は, 内皮細胞で完全に覆われていた。また, 組織内には内腔側から平滑筋細胞の浸潤が認められた。以前の処理法では認められた石灰化は改善しており, 特に肺動脈の下行大動脈移植において, 著明に軽減していた。【結論】超高压処理による脱細胞化されたグラフトは有望である。洗浄処理を変え, スキャフォールドの壁厚を薄くしたことで, 石灰化を軽減せしめたと考える。

G-120 自己細胞を用いた血管再生治療における人工マトリックスの重要性

神奈川県立循環器呼吸器病センター心臓血管外科<sup>1)</sup>, 横浜市立大学医学部人工臓器科学<sup>2)</sup>, 藤沢市民病院心臓血管外科<sup>3)</sup>, 上白根病院循環器科<sup>4)</sup>

市川 由紀夫<sup>1)</sup>, 梶原 博一<sup>1)</sup>, 野・色 泰晴<sup>2)</sup>, 山崎 一也<sup>3)</sup>, 真鍋 隆宏<sup>4)</sup>, 國井 佳文<sup>1)</sup>

【目的】生体では常に生理的に再生が行われ各臓器, 組織の機能が恒常的に維持され損傷部位は修復される。この自然治癒力を積極的に利用しようという再生医療が今日注目されている。機能不全に陥った動脈に対して, 本来細胞の持つ修復能力を誘導し血管を再生させその機能を回復させるには何が必要か, in vivoで自己細胞を用いた血管再生治療の結果から考察した。【方法】動脈閉塞疾患の患者自身の細胞を利用した2種類の異なる治療を行い比較した。1. 細切した自己皮下組織を繊維間隙にからませたポリエステル製人工血管を用いて閉塞の下肢血行再建術を行い, 遠隔期に摘出した2本のグラフトで組織学的検討を行った。2. 下肢血行再建術が困難な閉塞性動脈疾患患者14例の虚血下肢に自己末梢血単核球を移植し移植前後の臨床症状, 最大歩行距離, 血管造影で検討した。【結果】1. 感染のため移植後4ヶ月に摘出されたgraft内面は光沢を欠する白色の平滑な新生内膜で全長が覆われていた。内腔は吻合部付近だけでなくグラフト中央部にも認められ, グラフト吻合部付近にだけ内膜が被覆する通常のグラフトの内腔とはまったく異なっていた。表面に血栓の付着は認めなかった。閉塞のため移植後3ヶ月に摘出されたgraftでは繊維間隙から内面に向かい高度の毛細血管新生を認め, さらに全周的に弾性板を形成する中膜の再生を認めた。内膜の過形成はあったが人工血管を基材にした血管壁の再構築が認められた。2. 自己末梢血単核球を筋肉内に移植された患者は歩行距離が延長, 症状の軽快が認められたが, 血管造影で明らかな血管新生を認めなかった。【結論】自己細胞の筋肉への移植で臨床効果は得られたが, 血管造影で確認できるような明らかな血管新生を誘導することはできなかった。それに対して最適な人工血管の基材の検討は必要だが, 現存する材料でマトリックスを構築することで細胞の誘導が可能となり血管組織の再構築は可能になると考えられた。人工臓器をうまく利用し細胞を誘導することで血管組織を再構築でき自然治癒を誘導できる。これまでわれわれの経験では細胞の過形成を予防できず, 今後には細胞の制御をいかに行うかが重要な問題である。

## 高圧流体下における生体由来組織からの細胞抽出

○寺田堂彦(医療機器セ)・澤田和也(大阪成蹊短大)・吉田謙一(先端医療財団)・岸田晶夫(東京医科歯科大)・藤里俊哉(国立循環器病セ)・永谷憲哉(国立循環器病セ)・中谷武嗣(国立循環器病セ)・北村惣一郎(国立循環器病セ)

Extraction of cell from biological tissue under supercritical fluid condition

Dohiko TERADA (JAAME) Kazuya SAWADA (Osaka Seikei College) Kenichi YOSHIDA (FBRJ) Akio KISHIDA (Tokyo Med. Dent. Univ.) Toshiya FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA (NCVC)

### 1. はじめに

生体内における欠損した組織を、動物由来の組織と置換し、移植後に自己組織化を図る技術が再生医療の一手段として活発に研究されている。この手法においては、移植免疫を抑えるため、動物由来の細胞を除去する(脱細胞化)ことが必要となる。現在、種々の脱細胞化手法が提案されているが、生体への安全性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。

本研究では、以前より従来の脱細胞化手法に代わる新たな脱細胞化手段として、超臨界流体(二酸化炭素およびフルオロホルム)抽出法の適応について検討進めてきた。これらの媒体は、常温・常圧で気体状態であることから、処理後に自然拡散し、組織内に残存することはない。従って、化学物質の組織内残存を無視することが可能になり、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。さらに、超臨界流体は従来の脱細胞化媒体である液体と比較し、拡散係数が極めて大きく、逆に粘度は低い。その結果、組織内部への媒体の到達が容易となり、処理速度の大幅な短縮も期待される。

本発表では、二酸化炭素系または、フルオロホルム系へ必要に応じ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について検討した結果について報告する。

### 2. 実験方法

生体由来試料として用いた組織は、ブタ大動脈((株)ジャパンファーム)である。脱細胞化評価は、移植後の免疫反応や石灰化と密接に関連すると考えられる、細胞核およびリン脂質の残存により評価した。細胞核残存は組織染色法により行い、組織内残存リン脂質の評価は既報[1]に準じて化学分析を行った。超臨界流体処理は、定容高压容器を用い、振とう条件下にて所定の圧力・温度で行った。処理はバッチ形式および定流量のフロー形式下で行い、必要に応じエントレーナとして、エタノールを所定量共存させた。

### 3. 結果と考察

超臨界二酸化炭素を単独で媒体として用いた検討を行った結果、系の温度や圧力を変化させて行った場合でも、細胞の除去は確認されなかった。そこで、系の極性を上げるため、反応容器中の超臨界二酸化炭素に飽和溶解可能な量のエタノールを共存させ同様の検討を行った。処理後、脱細胞化を確認するため、HE染色により評価を行ったところ、細胞核は染色されなかった。本来何れの媒体にも溶解しない細胞核が、混合流体にすることにより溶解可能な誘電率に達し、溶解したことは興味深い。さらに特筆すべきは、処理時間の短縮であり、僅か15分の処理で細胞核の染色が見られなかった。高い拡散性を有する混合流体が組織内部へ素早く浸透した結果と考えられる。そこで、脱細胞化評価のもう一つの指標である、細胞膜リン脂質の評価も合わせて行った結果、細胞核の除去と同様、短時間で組織内リン脂質量が低下することも確認された。しかしながら、現段階ではフロー形式にて行った場合でも、完全にリン脂質を除去するには至らなかった。

そこで、処理後の降圧条件を変化させて同様に検討を行った結果を図1に示す。図の結果は、組織内部からの抽出物のマイグレーションが、圧力変化に伴う溶媒力の変化に大きく影響を受けることを示唆している。

本発表では、種々の処理パラメータと脱細胞化効果との関連について詳細に発表する。

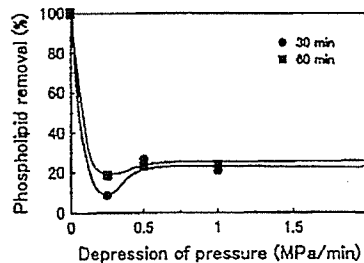


Fig.1 Variation of residual phospholipids in tissue as a function of depression of pressure

### 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

## A208 バイオリアクターを用いた血管 scaffold への細胞播種

### Cell seeding onto vessel scaffold using bioreactor

○学 戸川 祐一 (関西大), 江橋 具 (国立循環器病センター),  
吉田 謙一 (先端医療振興財団), 藤里 俊哉 (国立循環器病センター),  
正 大場 謙吉 (関西大), 中谷 武嗣 (国立循環器病センター)

Yuichi TOGAWA, Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita-shi, Osaka

Tomo EHASHI, National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka

Ken'ichi YOSHIDA, Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2, Minatojima Minamimachi  
Chuo-ku, Kobe, Hyogo

Toshia FUJISATO, National Cardiovascular Center, Kenkichi OBA, Kansai University,

Takeshi NAKATANI, National Cardiovascular Center

#### 1. 緒言

心停止者から提供された凍結保存心臓弁は、機械弁に比べ抗血栓性で、異種生体弁に比べ耐久性で、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っているとされる。しかしながら、特に若年者に用いた同種弁は、導管部分の狭窄や石灰化を特徴とする変化によって、比較的早く機能不全を起こすことも報告されている。そこで、我々は凍結保存同種弁から提供者由来の細胞成分や抗原性部位を除去し、コラーゲン線維や弾性繊維、基底膜などの構造マトリックスのみを用いた再生医療用心臓弁組織の開発を行っている。この心臓弁組織ヘレシビエントの自己細胞を組み込むことで、自己修復能や成長性を有する組織工学弁が創製できると期待できる。本報告では、弁組織に比べ、構造が単純である脱細胞化血管 scaffold への血管内皮細胞の播種について検討するとともに、循環型バイオリアクターによる培養についても検討した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 脱細胞化 scaffold

クラウン系ミニプタ (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) を行い、生理食塩水ベースの洗浄液処理にてドナー細胞を除去した組織を scaffold として用いた。

##### 2.2 細胞培養

本実験ではヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。培養には EBM (Endothelial Cell Basal Medium-2) に 2 % FBS および添加因子を加えた培養液を用いた。

##### 2.3 血管 scaffold への細胞播種・培養

アクリルで作製したモジュール内に細胞懸濁液と血管 scaffold を入れ密閉し、図 1 に示した回転型バイオリアクターを用いて、4 時間、縦回転と横回転を同時に行うことで HUVEC を血管 scaffold 表面に播種した。その後、細胞を播種した scaffold を、ガス交換能を有するカルチャーバッグに入れ、1 日間静置状態で培養し、さらに図 2 に示す閉鎖回路を用いた循環型バイオリアクターで培養を継続した。この時、scaffold を二つに切り、循環培養と静置培

養の 2 種類の培養方法の比較をおこなった。循環型バイオリアクターはローラーポンプを使用しており、流速は  $9.95 \times 10^{-3}$  [m/s]、培地量は 300 ml で実験を行った。

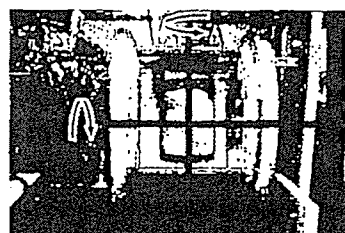


Figure 1. Image of Rotating bioreactor.

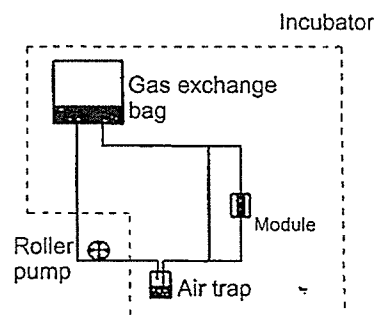


Figure 2. Schematic diagram of Circulation bioreactor.

##### 2.4 評価方法

血管 scaffold 表面の細胞をトルイジンブルー染色し、実体顕微鏡で観察した。

Calcein-AM と PI (Propidium Iodide) で生細胞と死細胞を同時に染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて血管 scaffold 表面の細胞が生存しているかの確認を行った。



### 3. 結果と考察

図3に1日間静置培養した後の血管 scaffold 内壁表面のトルイジンブルー染色画像を示す。HUVEC を播種した血管 scaffold を1日間静置培養することで、血管 scaffold 内壁に HUVEC を付着させることができた。

図4は静置培養1日間、循環培養2日間行ったトルイジンブルー染色画像で、図5は静置培養3日間行ったトルイジンブルー染色画像である。循環培養したもの、静置培養しか行わなかったもの、共に Scaffold 表面が HUVEC により、しっかりと覆われていることが分かる。また、図6、7は Calcein-AM と PI (Propidium Iodide) で生細胞と死細胞を同時に染色した画像で、図6は静置培養1日間、循環培養2日間行ったもの、図7は静置培養3日間行ったものである。図6と図7を比較すると、循環培養2日間行ったものは若干ではあるが、静置培養よりも HUVEC が伸展しているように見える。これは培地を循環させることにより生じた流れにより細胞に剪断応力がかかり、HUVEC が伸展したと考えられる。今後、長期間の培養を行い、剪断応力による内皮細胞の形態変化等についてさらに検討を進めていくことを考えている。

### 4 結論

超高静水圧印加処理と洗浄液による洗浄で脱細胞化した scaffold に HUVEC を播種・培養することができた。さらに循環型バイオリアクターを用いて、HUVEC に剪断応力を与えながら2日間培養すると、HUVEC に伸展が見られた。

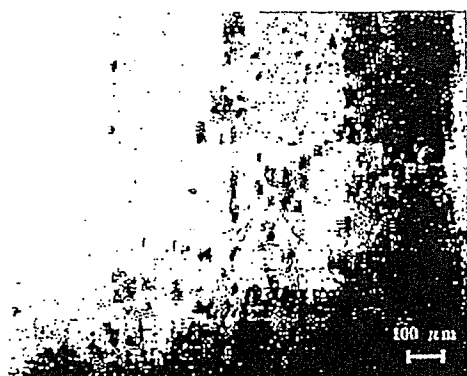


Figure 3. The inner surface of acellular aorta after static culture.

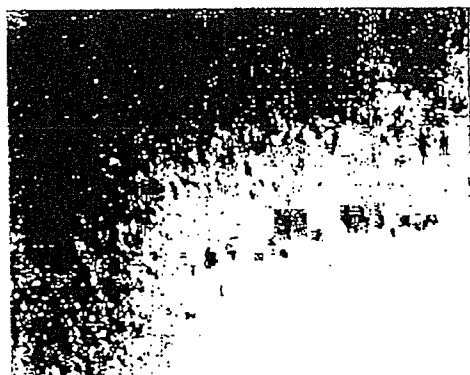


Figure 4. The inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.

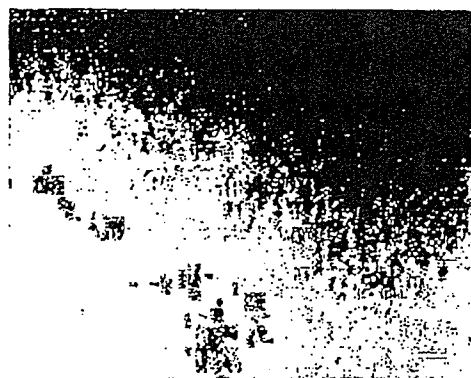


Figure 5. The inner surface of acellular aorta after 3days static culture.



Figure 6. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.

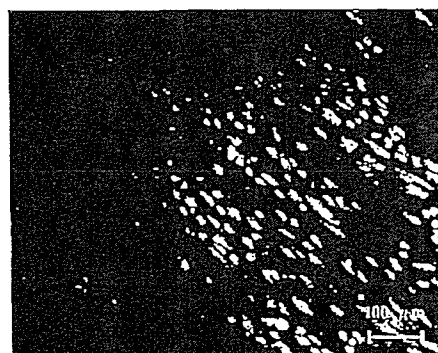


Figure 7. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 3days static culture.

## 再生骨格筋作製を目的とした間葉系幹細胞の伸長培養

○江橋 具<sup>1</sup>, 鎌田和加子<sup>1</sup>, 船本誠一<sup>2</sup>, 吉田謙一<sup>3</sup>,  
岸田晶夫<sup>2</sup>, 永谷憲歳<sup>1</sup>, 中谷武嗣<sup>4</sup>, 藤里俊哉<sup>1</sup>

1; 国立循環器病センター研究所 再生医療部

2; 東京医科歯科大学, 3; 先端医療振興財団

4; 国立循環器病センター 臓器移植部

### 1. 緒言

腫瘍切除や事故などによる筋組織の損失部分の補填、あるいは筋ジストロフィー症などの筋疾患を治療するために、自家筋組織の移植や細胞移植が行われている。しかし、これらの移植による治療法は、患者自身の筋組織から採取するために、患者の QOL の著しい低下が伴う。また、細胞移植では細胞の患者組織内への生着率が低いために効率が悪いことや、近年、心筋の治療などに盛ん研究されている細胞シートでも、大きく厚みのある筋組織を補填するには限界があると考えられる。

そこで本研究は筋組織治療用筋移植片を生体外にて作製することを目的として、骨髄由来間葉系幹細胞の、脱細胞化筋スキファールドを用いた三次元培養を行い、このとき細胞に伸長刺激を与えることによる、細胞の増殖や分化への影響について調べた。

### 2. 実験

三次元培養のための細胞の足場となるスキファールドは、ミニブタ大腿部骨格筋から作製した。骨格筋は 20 x 10 x 3 mm に薄切したのち、超高静水圧印加処理 (980 MPa, 10 min) と洗浄工程により脱細胞化して、スキファールドとした。細胞は、ラット骨髄から取得した間葉系幹細胞を単層培養して増幅させたものを剥離し、遠心操作 (100 x g, 1 min, 6 times) によりスキファールドに播種した。細胞播種後 3 日間の静置培養を行うことにより細胞をスキファールドに生着させてからスキファールドを伸長させた伸長培養と、対照として通常のディッシュによる単層培養、スキファールドによる三次元培養で伸長刺激を行わない静置培養を行った。培養 2 週間後の細胞の形態観察や筋細胞の分化マーカーの発現を調べることにより、三次元培養や伸長刺激が、間葉系幹細胞の増殖や分化に及ぼす影響について検討した。

### 3. 結果と考察

超高静水圧印加処理により作製した脱細胞化筋スキファールドは、HE 染色による形態学的観察や DNA 量の測定により、良好に脱核されているのが確認された。遠心操作による細胞の播種後 1 日の HE 染色から、細胞はスキファールド内の筋細胞であった部分よりも、結合組織などが存在していたと考えられる部分に侵入し、スキファールド表面から 100 μm 付近の深い部分にも存在していることがわかった。静置培養 3 日間の細胞生着期間後、伸長培養と、対照としての静置培養を行ったところ、そのまま静置培養を続けた場合は細胞がスキファールド骨格の中で丸い形状のまま存在していたものの、3 日間伸長培養をした後には伸長方向と平行な方向に細胞が伸展しているのが観察された。

これらの結果から、スキファールドを用いる三次元培養において伸長刺激が、間葉系幹細胞の分化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。



Fig. MSCs inoculated in decellularized muscle scaffold showed extended shapes after three days of elongation culture.

Elongation culture of MSCs for skeletal muscle regeneration in vitro

Tomo EHASHI, Wakako KAMATA, Seichi FUNAMOTO, Ken'ichi YOSHIDA, Akio KISHIDA,

Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Toshia FUJISATO

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering

National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka

Tel: +81-6-6833-5012, Fax: +81-6-6835-5496, E-mail: ehashi@ri.ncvc.go.jp

## 生体組織内コラーゲン構造を利用したバイオスキャフォールドの開発

○ 寺田堂彦<sup>1,2</sup>・澤田和也<sup>3</sup>・緒方裕之<sup>1</sup>  
 吉田謙一<sup>4</sup>・船本誠一<sup>5</sup>・藤里俊哉<sup>1</sup>  
 岸田晶夫<sup>5</sup>・永谷憲歳<sup>1</sup>・中谷武嗣<sup>1</sup>

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

### 1. 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、その成長性の欠如から、小児患者では成長に合わせた再移植が必要であるなどの問題点は残されたままであるため、再生型人工血管の開発が望まれる。血管組織再生のためには細胞の足場（スキャフォールド）が必要不可欠である。スキャフォールドにはポリマーなどの人工材料からなるものと、生体組織からなるバイオスキャフォールドとがあり、我々はこれまで再生型バイオスキャフォールドに関する研究開発を行ってきた。バイオスキャフォールドの利点として、生体適合性、生体吸収性、柔軟性などが挙げられるが、一方で石灰化などに因る狭窄、破断、機能不全などの不具合も認められる。石灰化の機序は未だ不明であるが、移植用組織内に残留している細胞残渣と同様に、エラスチンもカルシウム沈着の起点であると考えられている。つまり、脱細胞化と同時に、脱エラスチン化されたバイオスキャフォールドは非石灰化性を有することが期待される。そこで、生体血管組織の脱エラスチン化手法を開発し、大動物実験により石灰化抑制効果についての検討を行った。

### 2. 実験

血管組織試料としてブタ大動脈（株）ジャパンファーム）を用いた。120 °C、24 時間の熱脱水架橋（Dehydrothermal treatment, DHT）を施した血管組織に対し、エラスターゼ/トリス緩衝溶液（elastase, 0.57 µg/ml; CaCl<sub>2</sub>, 10 mM; NaN<sub>3</sub>, 0.02%; pH 8）中に浸漬し、37 °C で 72 時間振盪処理することによってエラスチンを分解除去した。その後、80 v%エタノールに浸漬し 37 °C で 72 時間振盪処理することによってリン脂質を抽出除去した。作製された試料に対し、組織学的観察、引張試験、DNA 定量、リン脂質定量、コラゲナーゼ分解性試験、ラット皮下およびミニブタ同所性への移植実験を行なった。

### 3. 結果

DHT 処理によってタンパク質は安定化するが、酵素的手法によって血管組織からエラスチンは完全に除去され、コラーゲン構造のみが残存した血管構造体を得ることが出来た。エラスチンの分解に伴って力学特性は低下するが、適度に架橋されたコラーゲンが残存することで、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。得られた組織のラット皮下移植実験を行い、移植後 12 週で取り出して組織内 Ca 量を原子吸光度法で定量したところ、Ca 沈着は認められなかった。

ミニブタ下行大動脈より作製した脱エラスチン化組織の同種同所性移植を行い、移植後 3 ヶ月で取り出したところ、コッサ染色で石灰化は認められなかった。α-SMA、ビメンチン染色により、移植組織内にはレシピエント由来の平滑筋細胞および線維芽細胞が数多く浸潤していることを確認した。しかしながら、若干の内膜の肥厚化が確認された。

本手法により作製されたスキャフォールドは、移植後 3 ヶ月までに血管壁内の自己細胞化はほぼ達成された。自己細胞化に引き続き、コラーゲンなどの構造タンパクも新たに産生され、徐々に自己組織化されていくことが期待される。今後さらに長期経過を観察する必要はあるが、自己血管組織再生のための非石灰化性バイオスキャフォールドを作製出来る可能性が示唆された。

---

Development of a bioscaffold composed of original collagenous structure in a biological tissue.  
 Dohiko TERADA<sup>1,2</sup>, Kazuya SAWADA<sup>3</sup>, Hiroyuki OGATA<sup>1</sup>, Ken'ichi YOSHIDA<sup>4</sup>, Seiichi FUNAMOTO  
 Toshia FUJISATO<sup>1</sup>, Akio KISHIDA<sup>5</sup>, Noritoshi NAGAYA<sup>1</sup>, and Takeshi NAKATANI<sup>1</sup>

1 Department of Regenerative Medicine and Tissue engineering, National Cardiovascular Center  
 Research Institute, 2 JAAME, 3 Osaka Seikei College, 4 FBRI, 5 Tokyo Med Dent Univ  
 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita city Osaka 565-8565, Japan  
 Tel: +81-6-6833-5004(ext. 2362) Fax: +81-6835-5496 E-mail: terada@ri.ncvc.go.jp

## バイオサーファクタントを用いた生体由来 スキャフォールド調製

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

### 1. 緒言

欠損した生体組織を動物由来組織と置換し、自己組織化を図る再生医療技術の開発が近年注目されている。生体由来組織は、高分子合成により作成された人工組織に比べ、組織の複雑な形状を保持できることに加え、継続した耐久性を期待出来るなどの利点が多い。一方、生体由来組織を用いる場合、免疫反応を抑えるためにドナー由来の細胞を除去する(脱細胞)ことが必要となる。従来までの主な脱細胞化技術として、細胞毒性を有する合成界面活性剤や化学薬剤を用いた処理が挙げられる。しかし、それらの組織内残存や組織の硬化等の問題が残されている。本研究では、有害な薬剤を用いない新たな脱細胞化手法として、植物由来のバイオサーファクタントを用いて脱細胞化を行った。さらに、脱細胞化組織の生体への安全性を評価するため、ラットへの移植実験を行った。

### 2. 実験

試料として用いた組織は、清潔下に摘出したブタ大動脈(株) ジャパンファーム)である。脱細胞化剤として、リグニンスルホン酸塩(キシダ化学(株))を用い、所定濃度の水溶液を滅菌後使用した。脱細胞化は、ブタ組織をリグニン水溶液に所定期間浸漬することにより行った。脱細胞化評価は、組織染色およびDNAの直接定量により評価した。脱細胞化組織の生体への安全性および石灰化度を評価するため、ラットへの皮下移植を行い、所定期間後に摘出し免疫反応および石灰化度を評価した。免疫反応は組織染色により、石灰化度は組織染色および原子吸光分析法を併用して行った。

### 3. 結果と考察

脱細胞処理を行なうにあたり、リグニンが有する細胞毒性を予め評価した結果、本検討で用いる濃度範囲においては、細胞への毒性は検出されなかった。そこで、ブタより摘出した組織を清潔下にて2週間リグニン水溶液に浸漬を行ったところ、HE染色による細胞核の染色は見られなかった。また、DNAの直接定量も合わせて行った結果、HE染色の結果と同様に脱核化が達成されていることが分かった。そこで、脱細胞化された組織を用い、最長12週間のラットへの皮下移植を行った。図1はその結果の一例であり、組織の石灰化を評価するため、12週間後に摘出した組織の von Kossa 染色結果である。図から明らかなように、上段のコントロールは明らかな石灰化が認められた。一方、下段に示したように、リグニンにより脱細胞化を行った組織には石灰化が見られず、同法により脱細胞化の達成だけでなく、石灰化抑制効果があることも明らかとなった。本発表では、その他免疫反応の結果を含め、バイオサーファクタントを用いた脱細胞化の可能性について発表する。

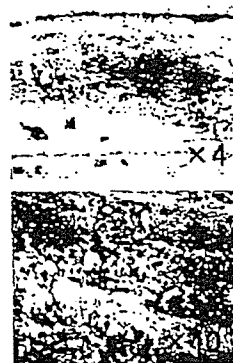


Fig.1 Microscopic images of von Kossa stain  
Samples were isolated from rat after 12 weeks implantation  
upper: control, lower: lignin

#### Preparation of bio-scaffold utilizing bio-surfactant

Kazuya SAWADA, Dohiko TERADA, Tomo EHASHI, Kenichi YOSHIDA, Seiichi FUNAMOTO, Akio KISHIDA, Toshiya FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, Soichiro KITAMURA  
Department of Integrated Life, Osaka Seikei college, 3-10-62 Higashiyodogawa-ku Aikawa, Osaka  
533-0007, Japan

Tel:+81-6-6829-2561, FAX:+81-6-6829-2561, E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp

## 超高圧誘起 PVA/DNA 遺伝子ベクターへの無機塩付加による 遺伝子導入促進

○木村剛<sup>1)</sup>・小粥康充<sup>2)</sup>・岡田正弘<sup>3)</sup>・古菌勉<sup>3)</sup>・  
六雄伸悟<sup>4)</sup>・吉澤秀和<sup>4)</sup>・藤里俊哉<sup>5)</sup>・岸田晶夫<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、2) 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ大阪 古菌プロジェクト、3) 国立循環器病センター研究所 生体工学部、4) 岡山大学、環境理工学部、5) 国立循環器病センター研究所 再生医療部

### 1. 緒言

エンドサイトーシス経路を介する非ウイルス遺伝子デリバリーでは、エンドソームから細胞質への移行が重要となる。これまで、エンドソームの酸性化をトリガーとし、エンドソーム膜を破壊する遺伝子ベクターの分子設計が行われてきた。膜破壊性のカチオン性両親媒ペプチド、ヒスチジン含有ペプチド、あるいは、プロトンスポンジ効果を誘導するカチオン性ポリマーなどである。遺伝子導入促進は達成されているが、そのカチオン性に由来する細胞傷害性が問題として残る。一方、リン酸カルシウムなどの無機塩と DNA との共沈殿物がエンドソームの酸性下で溶解され、エンドソームからの遺伝子の遊離が報告されているが、その再現性、安定性は低い。我々は、細胞障害性の低減を目的に、非電荷ポリマーであるポリビニルアルコール (PVA) を用い、超高圧印加法にて誘起される PVA/DNA 複合体の遺伝子ベクターとしての応用を検討している。細胞内導入は達成されるが、有意な遺伝子発現は認められなかった。本研究では、PVA/DNA 複合体への無機塩の付加による遺伝子導入促進について検討した。

### 2. 実験

無機塩として、ハイドロキシアパタイト (HAp) を用いた。改良型マイクロエマルジョン法により、形状および酸溶解性の異なる HAp を調製した。HAp 濃度、分散処理条件の最適化を行い、超高圧処理装置 ((株)神戸製鋼所) を用いて 37°C、10,000 atm の超高圧処理を施し、HAp 含有 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。蛍光ラベル化プラスミド DNA を用いて、COS7 細胞への遺伝子導入・発現を検討した。

### 3. 結果と考察

所定濃度の PVA 水溶液に HAp を添加し、超音波処理により高分散溶液を得た。DNA 溶液を混合し、超高圧印加処理を施した。SEM 観察では、PVA/DNA 複合体に比べ、HAp を混合した複合体の表面での凹凸が観察され、PVA/DNA 複合体への HAp の含有が明らかとなった。また、得られた HAp 含有 PVA/DNA 複合体溶液の pH 滴定により、HAp の酸溶解性が確認された。蛍光ラベル化 DNA を用いて細胞内導入について検討した結果、HAp 含有 PVA/DNA 複合体の有意な細胞内導入が示された。HAp 含有による有意な遺伝子発現が示されたが、市販の遺伝子導入剤に比して低く、更なる改善が必要である。本研究は、厚生労働省科学研究補助金の助成を受けて行われた。

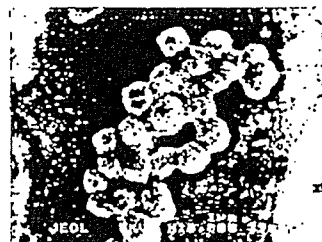


Fig. SEM image of PVA/DNA complexes containing HAp.

## Enhancement of gene transfection using PVA/DNA complex containing inorganic salts formed by ultra high pressure treatment

Tsuyoshi KIMURA<sup>1)</sup>, Yasumichi KOGAI<sup>2)</sup>, Masahiro OKADA<sup>3)</sup>, Tsutomu FURUZONO<sup>3)</sup>, Shingo MUTSUO<sup>4)</sup>,  
Hidekazu YOSHIZAWA<sup>4)</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>5)</sup> and Akio KISHIDA<sup>1)</sup>

1) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,  
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan

2) Innovation Plaza Osaka, Japan Science and Technology Agency, Osaka, Japan.

3) Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute

4) Department of Material and Energy Science, Okayama University

5) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,

National Cardiovascular Center Research Institute

Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: Kishida\_fm@tmd.ac.jp

## 超高压印加法を用いた脱細胞化角膜の作製と物性解析

○橋本良秀<sup>1)</sup>、船本誠一<sup>1)</sup>、木村剛<sup>1)</sup>、  
藤里俊哉<sup>2)</sup>、小林尚俊<sup>1)3)</sup>、岸田晶夫<sup>1)</sup>

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研究所 再生医療部、3) 物質・材料研究機構 生体材料センター

## 1. 緒言

近年、角膜移植技術の向上によりその成功率は90%を超えるが、圧倒的なドナー不足が大きな問題である。この問題に対して、種々の人工角膜の開発が行われているが、移植後の感染や脱落などの課題が残っている。一方、異種組織から細胞を除去し、残存する基材を移植組織として用いる方法が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高压印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高压印加法を考案した。本手法では、細胞残渣の除去による免疫反応の抑制と生体の微小構造の保持による適合性の向上が期待できる。本研究では、超高压脱細胞化法による脱細胞化角膜の調製とその物性解析を行ない、角膜移植片としての可能性を検討した。また、一般的な脱細胞法である界面活性剤を用いた脱細胞化角膜の調整についても比較検討した。

## 2. 実験

生体ブタ眼球を購入し、角膜全層を摘出した。界面活性剤としては、TritonX-100、SDSを用いた。それぞれの1%溶液に角膜を浸漬し、37°Cにて24時間インキュベートした。PBSにて24時間洗浄後、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色標本作製し、脱細胞化を評価した。一方、冷間等方圧加圧装置((株)神戸製鋼所)を用いて、種々の温度で4,000あるいは10,000気圧にて10分間の圧力印加を施した。その後、培養液に浸漬し、3日間振盪することで細胞成分の残渣を除去した。得られた脱細胞化角膜標本の組織断面をH-E染色により顕微鏡観察し、脱細胞化を評価した。圧縮試験により力学的物性評価を行った。

## 3. 結果と考察

TritonX-100による脱細胞化では、若干膨張した半透明な角膜が得られた。H-E染色標本観察では、コラーゲン構造の配向は保たれているものの、多数の細胞核が観察され、脱細胞化されていなかった。SDSでは、角膜の円周部の溶解と中央部での有意な膨張、白濁が見られた。また、不完全な脱細胞化とコラーゲン繊維の切断および配向の乱れがH-E染色標本観察で示された。これらの結果より、角膜の脱細胞化においては、界面活性剤の利用は不適であると言える。

超高压処理法による角膜の脱細胞化では、圧力の上昇により透明性は低下し、10,000気圧では白濁した角膜が得られた。圧力印加直後の角膜の膨張は認められず、3日間の洗浄後に約2倍膨張した。H-E染色により、完全な細胞除去が示され、また、コラーゲン繊維の配向は比較的保存されていた。白濁した脱細胞化角膜をグリセロールに浸漬した結果、透明性は回復された。圧縮試験でも、超高压処理による弾性率変化が示されたが、グリセロール浸漬により弾性率は回復し、未処理の角膜に類似した物性が示された。角膜では、細胞による浸透圧調整により透明性が保持されており、上記の結果は、脱細胞化角膜への細胞生着がなされることで、透明性が得られる可能性を示唆している。本研究は、文部科学省科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。



Fig. H-E staining of the decellularized cornea by ultra high pressurization

Preparation of the decellularized cornea by ultra high pressure treatment  
Yoshihide HASHIMOTO<sup>1)</sup>, Seiichi FUNAMOTO<sup>1)</sup>, Tsuyoshi KIMURA<sup>1)</sup>, Toshiya Fujisato<sup>2)</sup>, Hisatoshi KOBAYASHI<sup>1) 3)</sup> and Akio KISHIDA<sup>1)</sup>

1) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan

2) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute

3) Biomaterials Center, National Institute for Materials Science

Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: Kishida\_fm@tmd.ac.jp

## 高圧印加処理による脱細胞化組織を用いた、 膝関節再建術用の新しい Scaffold の検討

○ 山田康貴<sup>1,5</sup>、木村剛<sup>2</sup>、藤里俊哉<sup>3</sup>、坂根正孝<sup>4</sup>  
宮川俊平<sup>5</sup>、岸田晶夫<sup>2</sup>、植村寿公<sup>1</sup>

- 1 産業技術総合研究所 ナノテクノロジー研究部門  
ナノバイオ・メディカルテクノロジーグループ  
2 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所  
3 国立循環器病センター研究所 先端医工学センター 再生医療部  
4 筑波大学 臨床医学系 整形外科  
5 筑波大学大学院博士課程 人間総合科学研究科 スポーツ医学専攻

### 1. 緒言

膝関節の再建術には一般に自己の組織を用いる自家移植が多く用いられている。しかし、自家移植には、採取部の侵襲性や移植組織として用いる事のできる量に限界があるなどの問題点がある。一方、異種移植は移植後の拒絶反応や感染が問題となっている。近年、異種移植に用いる組織を脱細胞化し、拒絶反応や感染の可能性を無くした移植組織として用いる研究が行われている。我々は高圧印加処理を用いて脱細胞化した膝関節組織の再建術用の新しい scaffold としての可能性を検討した。

### 2. 実験

ブタ後肢から膝蓋骨-膝蓋靭帯-脛骨の複合組織、腱、半月板を採取し、高圧印加処理を行い、脱細胞化を行った。組織学的評価に用いる組織は4%パラホルムアルデヒドで固定し、凍結切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色を行った。生化学的評価に用いる組織は、直ちに凍結乾燥させ DNA 定量を行った。また、高圧印加処理による腱実質物性の評価として、ラット尾より採取した腱を用いて力学的、組織学的評価を行った。Wister ラット尾より腱を採取し、高圧印加処理を行い、引っ張り試験機を用いて力学的強度を測定した。コントロール群として、高圧印加処理を行わない正常の腱を用いた。また、高圧印加処理後の腱を透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察を行った。

### 3. 結果と考察

ブタの組織を用いた H-E 染色より、高圧印加処理によって膝蓋骨-膝蓋靭帯-脛骨の複合組織、腱、半月板の組織より細胞が除去されていることが明らかになった。(図1) また、DNA 定量の結果から正常の組織と比べて DNA が有意に減少していた。



図1：脱細胞化した膝蓋骨

ラットの尾の腱を用いた力学試験では、破断応力が高圧印加処理を行った群の方が処理を行わない正常の腱に比べて有意に高くなった。また、TEM では高圧印加処理群では核の断片化が観察された。

高圧印加処理によって膝関節を構成する主要組織を脱細胞化が可能であった。また、高圧印加処理を行うことにより、力学的強度が増加することが明らかになった。再生用のスキャホールドとして有用であると考えられる。

Yasutaka YAMADA, Tsuyoshi KIMURA, Toshiya FUJISATO, Masataka SAKANE, Shumpei MIYAKAWA, Akio KISHIDA, Toshimasa UEMURA  
Nanotechnology Research Institute (NRI), Nano-biomedical Technology Group, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8562, Japan  
TEL: +81-29-861-2559 FAX: +81-29-861-2789 yasutaka-yamada@aist.go.jp

## 一般演題抄録

### 1-1 Regenerative small-diameter vascular graft using acellular tissue

Wang Liming, Toshia Fujisato, Dohiko Terada, Takeshi Nakatani

Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,  
National Cardiovascular Center Research Institute

**Background and aim** Although many efforts have been made to generate small-diameter (<6mm) vascular grafts by means of tissue engineering, improvement in patency and functionality still remains a great challenge. We have developed cold isostatic pressing (CIP) method to decellularize porcine aortas and pulmonary arteries for acellular vascular scaffolds. The scaffolds transplanted into the allogeneic miniature pigs have showed good cell repopulation after 6 months. In this experiment, this method was applied to small-diameter vascular grafts harvested from rats.

**Method** Syngenic male SD rats were used as donors of vascular grafts. Under anesthesia, the abdominal and thoracic aortas were exposed and harvested. The abdominal aortas were packed in sterile bags filled with PBS and treated by ultrahigh pressure of 980 MPa at 10°C using a CIP apparatus (Kobe steel LTD, Kobe, Japan) for 10 min. They were then rinsed by PBS-based washing solution for 2 weeks and alcohol aqueous solution for 2 days at 37 °C with gentle stirring. The inner surface of thoracic aorta was scrubbed and endothelial cells were collected. The cells were cultured with endothelial cell basal medium-2 in an incubator at 37 °C with 5%CO<sub>2</sub>. After 3 or 4 passages, the endothelial cells were seeded onto the inner surface of acellular abdominal aorta.

**Results** After decellularization procedure, H.E staining showed that no cells could be found in graft wall, and only fibrous skeleton of vessel was left. The cavity was relatively soft compared with native tissue.

**Conclusion.** This process does not include any detergent, and the treatment is able to sterilize the tissue in addition to decellularization. This treatment maybe applicable for small-diameter vascular tissue regeneration.



# 注射器を用いる新規細胞播種法の開発

国立循環器病センター 研究所 再生医療部

○江橋 具、染川将太、藤里俊哉

## 【緒言】

近年、再生医療の技術を用いた治療法として、細胞を三次元的なスキャフォールドに播種して移植する、あるいは細胞を直接組織に注入する方法が検討されている。例えば、心筋梗塞による心筋傷害部位に、ゲルに細胞を懸濁してパッチ状に貼り付ける方法や、患者の細胞をカテーテルを用いることにより直接筋組織内部に移植する方法が報告されている。われわれはこれまでに、心筋梗塞などの心筋機能低下を治療するためのスキャフォールドとして、脱細胞化筋組織の利用について検討してきた。しかし、脱細胞化心筋組織は組織間隙が小さく密な構造を保持していたため、通常の方法で細胞を播種することが困難であった。

そこで本研究は、脱細胞化心筋組織や生体組織のように空隙率の低いスキャフォールド・組織へ細胞を分散させて播種することが可能で、担体や組織への損傷を最小限に抑えることが可能となる、新規細胞播種法の開発を目的とした。

## 【実験方法】

細胞を播種するスキャフォールドとして、超高静水圧印加処理により脱細胞化したブタ心筋組織を用いた。細胞播種には ShimaJET (U-100 インスリン自己注射用 針無圧力注射器: 島津製作所, 京都) を、また対照として通常の注射針を用いる注射器を使用した。

培養皿から剥離した線維芽細胞を培地に懸濁したのち、ShimaJET の通常的使用方法に従って針無注射器のノズルに充填し、スキャフォールドに細胞を注射した。細胞を播種したスキャフォールドは、培養皿に移して培地を添加し、1 日間培養した後、スキャフォールド内部の細胞の生死を共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。

## 【結果と考察】

通常の針を用いる注射器により細胞をスキャフォールドに播種したところ、スキャフォールド内部で細胞懸濁液が液溜まりを形成し、細胞をスキャフォールド内に分散させて播種することは困難であった。また、注射針が通過することによるスキャフォールドの損傷が確認された。一方、針無注射器を用いた場合は、注射器の圧力による細胞への傷害も少なく、播種してからもスキャフォールド内で良好に生存していることが確認された。また、針を使った場合とは異なり、スキャフォールドのさまざまな深さに、個々の細胞が分散して播種されたことがわかった。

以上の結果から、本研究で用いた針無注射器による細胞播種法は、細胞への傷害を引き起こすことなく、三次元的なスキャフォールドの内部に分散して細胞を播種することが可能となった。この手法は、生体組織への直接細胞注入にも応用できる可能性があり、今後、既存の細胞播種・注入法よりも簡便な手法として利用できることが期待できる。

## 一般演題 15

### ブタ脱細胞化角膜による角膜移植用組織の開発と *in vivo* 評価

船本誠一<sup>1)</sup>、橋本良秀<sup>1)</sup>、佐々木 秀次<sup>4)</sup>、木村剛<sup>1)</sup>、藤里俊哉<sup>2)</sup>、小林尚俊<sup>1) 3)</sup>、岸田晶夫<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 分子制御分野、2) 国立循環器病センター研究所 再生医療部、3) 物質・材料研究機構生体材料センター、4) 東京医科歯科大学 医学部附属病院 眼科

#### 【緒言】

近年、種々の人工角膜の開発が行われているが、移植後の感染や脱落などの課題が残り、長期間有用である人工角膜開発には至っていない。一方、異種組織から細胞を除去し、残存する基材を移植組織として用いる方法が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高圧印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高圧印加法を考案した。本手法では、細胞残渣の除去による免疫反応の抑制と生体の微小構造の保持による適合性の向上が期待できる。本研究では、超高圧脱細胞化法による脱細胞化角膜の作製とその物性解析を行ない、角膜移植片としての可能性を検討した。また、一般的な脱細胞法である界面活性剤を用いた脱細胞化角膜の調整についても比較検討した。

#### 【方法】

成体ブタの眼球((株)東京芝浦臓器)を購入し、角膜を採取した。超高圧印加装置を用い、10℃と30℃にて4,000~10,000気圧の超高圧印加を10分間行った。続いて洗浄液にて3日間の洗浄を行い、細胞残渣を除去した。処理後の組織を組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。また、透過率、力学特性の測定およびウサギを用いた *in vivo* 試験により基礎評価を行った。

#### 【結果・考察】

超高圧処理した角膜の脱細胞化をHE染色にて評価した。脱細胞化角膜では完全な細胞除去が達成され、コラーゲン線維の配向も維持されていた。しかしながら、超高圧処理した角膜は、圧力の上昇に伴う透明性の低下が観察され、力学特性にも変化が見られた。また、3日間の洗浄により膨潤も認められた。これは角膜内皮細胞の損傷によるポンプ機能の停止によるものと考えられる。しかし、ポンプ機能モデルとして白濁した角膜をグリセロール処理した結果、透明性の回復が認められ、力学特性も未処理と比べて変化は見られなかった。ウサギ移植実験では、移植直後の脱細胞化移植片は白濁しているが、移植後4週で移植組織片の白濁が取れ透明な組織片となり、8週間後でも透明性を保っていた。このことより、脱細胞化角膜の角膜移植片としての可能性が示唆された。

O-10-2 ラット骨格筋筋芽細胞から収縮する筋繊維  
P-372 をつくる -電気刺激の分化促進効果-

河原 裕美<sup>1</sup>, 山岡 薫<sup>1</sup>, 梅田 知佳<sup>1</sup>, 吉元 玲子<sup>1</sup>,  
佐々木 輝<sup>1</sup>, 呉 樹亮<sup>1</sup>, 新田 純子<sup>1</sup>, 真鏡 朋誉<sup>1</sup>,  
岩田 全広<sup>2</sup>, 梶梅 輝之<sup>2</sup>, 弓削 類<sup>2</sup>

<sup>1</sup>広島大学大学院保健学研究科, <sup>2</sup>広島大学大学院医歯薬学総合  
研究科

【目的】培養筋芽細胞に電気刺激を行い、形態学的、分子生物  
学的手法を使って筋芽細胞の分化に与える影響を検討した。

【方法】培養細胞は、ラット骨格筋由来の筋芽細胞 L6 株 (IFO  
50364) を用いた。実験群は、電気刺激を行った電気刺激群と正  
常培養した対照群の 2 群に分けた。電気刺激の条件は、矩形波、  
刺激頻度 0.5 pulse/sec, 持続時間 2.0msec, 電圧 50 V, 刺激  
時間 5 分/日とした。電気刺激群は、培養開始日から 6, 8, 10,  
12 日後に電気刺激を行い、その後は刺激を施行せず培養を続けた。

【結果】電気刺激群では、培養 10 日後と 12 日後の筋管細胞数  
が対照群と比べ有意に多く、太い筋管細胞が出現した。さらに、  
培養 18 日後には横紋構造を持った筋線維が自動収縮を始めた。  
収縮中の培養筋線維の膜電位を計測すると、静止電位の低下と  
活動電位に近い波形が観察された。筋の分化マーカーのタンパク  
質発現をみると、電気刺激群では、筋の分化・成熟に関与する m  
yogenin, Myf-6, M-cadherin の発現が強かった。また、電気  
刺激群では、connexin43 の強い発現が持続した。【考察】本研  
究で使用した筋芽細胞 (L6) は、通常の培養条件では筋管細胞  
までしか分化しない。電気刺激を加えることで筋管細胞が成熟  
するだけでなく、横紋構造を持った筋線維が出現し、自動収縮し  
たことは注目すべき点である。電気刺激という物理的刺激のみで  
筋細胞の分化・成熟をコントロールできる可能性が示唆された。

O-11-1 リコンビナント細胞外マトリックスタンバ  
P-002 ク質を用いたカニクイザル ES 細胞の未分化  
維持培養

佐藤 秀樹<sup>1</sup>, 末盛 博文<sup>1</sup>, 戸口田 淳也<sup>1</sup>,  
岩田 博夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学再生医科学研究科組織修復材料科学分野, <sup>2</sup>京都大学再  
生医科学研究科産長類胚性幹細胞研究領域, <sup>3</sup>京都大学再生医  
科学研究科組織再生応用分野

ヒト ES 細胞の樹立、未分化維持培養にはマウス胎児線維芽細胞  
がフィーダー細胞として使用されてきた。しかし、ヒト ES 細胞の  
臨床応用を考えると、マウス由来の病原体によりヒト ES 細胞が  
汚染される危険性のない培養法の確立が望まれている。そこで最  
近、フィーダー細胞フリーの条件下で完全合成培地を用いて、ヒ  
ト ES 細胞の樹立、培養が行われた。しかし、この培養方法では  
ヒト ES 細胞はヒト由来の細胞外マトリックスタンパク質でコート  
された培養基材上で培養されているため、ヒト ES 細胞がヒト由  
来の病原体に汚染される可能性は否定できない。そこで本研究では、  
大腸菌により発現されたリコンビナント細胞外マトリックスタンバ  
ク質と不死化ヒト間葉系幹細胞の頓化培養液を用いて、ヒト ES  
細胞と共通点の多いカニクイザル ES 細胞の未分化維持培養を試  
みた。この培養条件下で 20 回以上の継代を行った ES 細胞につい  
て幹細胞マーカーの発現を免疫染色と RT-PCR で解析したところ、  
SSEA4, Oct3/4, Nanog 陽性であった。また、この ES 細胞を  
ヌードマウスの皮下に移植し、8 週間後に形成されたテラトーマは  
三胚葉の組織を含んでいた。これらの結果はマウス由来のフィーダー  
細胞やヒト由来の細胞外マトリックスタンパク質を使用せずに、カ  
ニクイザル ES 細胞を長期培養することができたことを示すもので  
あり、ES 細胞の臨床応用への期待を持たせる結果である。

O-10-3 骨格筋再生を目指した骨髄由来間葉系幹細  
P-374 胞の静的伸長培養

江橋 具<sup>1</sup>, 永谷 憲歳<sup>1</sup>, 橋本 成広<sup>1</sup>, 藤里 俊哉<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>国立循環器病センター研究所再生医療部, <sup>2</sup>大阪工業大学

【目的】腫瘍の摘出などによる組織欠損部位の補填のために、  
患者の別の部位から組織を移植する治療が行われている。しか  
しこの場合、健康組織を摘出することによる患者の QOL の低  
下は著しい。また、糖尿病などが原因の大規模な組織の欠損に  
対して、現在のところ切除以外の有力な治療法がない。そこで  
本研究では、これらの治療に用いるための移植用組織を作製す  
ることを目的とした、脱細胞化筋スキューフォールドを用いた骨  
髄由来間葉系幹細胞の培養を行った。間葉系幹細胞は、通常培  
養により筋細胞へと分化誘導されることが知られているが、本  
研究では細胞に静的伸長刺激を与えることによる細胞の分化の  
影響を調べた。

【実験】ラット骨髄由来間葉系幹細胞を分離・培養し、超高速  
水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化筋スキューフォールドに  
播種して、培養を行った。培養条件として、通常のディッシュ  
による培養と、スキューフォールドを用いる三次元培養を行  
った。三次元培養ではさらに伸長刺激を与える群と刺激を与えないコ  
ントロール群の三通りを設定した。これらの細胞の筋細胞特異  
なマーカーとなる mRNA の発現量を経時的に測定するとともに、  
細胞の形態を観察した。

【結果と考察】スキューフォールドを用いた静的伸長刺激では、  
刺激開始から 3 日目においてほとんどの細胞が伸長方向に向  
く伸びた形態を示したことから、伸長刺激により間葉系幹細胞  
が筋細胞へと分化している可能性が示唆された。

O-11-2 カニクイザル ES 細胞からの無フィーダー培  
P-010 養条件下における継代培養可能な血管内皮  
細胞への分化誘導

中村 直子, 過足 芳子, 佐伯 久美子, 中原 正  
佐伯 晃一, 松山 さと子, 湯尾 明  
国立国際医療センター研究所血液疾患研究部

血管はほぼ全ての臓器に存在し、生体は血管を通して栄養  
気の交換を行うため不可欠な組織である。すなわち再生医療  
場において、血管を構成する主要素である血管内皮細胞の樹立  
は重要な課題となっている。我々は今回、無血清培養下でカ  
ニクイザル ES 細胞から無フィーダー培養条件下で継代可能な  
内皮細胞を高効率に分化誘導する新しい系を確立した。カ  
ニクイザル ES 細胞から特定のサイトカイン存在下でハンキン  
グロップ法により胚様体様細胞凝集塊を形成し、ゼラチン  
コートした培養皿で接着培養した。接着した細胞から囊状構造物が出現し、  
一部に cobblestone 様細胞が充満した。これらの細胞はコ  
マッセイ及び、特殊染色の結果から、骨髄芽球とマクロ  
ファージからなる血球集団と結論された。一方の囊状構造物と  
並に広がる接着細胞は western blot 法、免疫染色、FACS  
分析により、VE-cadherin 発現が認められた。特に FACS  
では、VE-cadherin と PECAM1 が同時に発現する細胞  
40% 存在しており、従来の報告 (<2%) より高効率であ  
り、またこれらの細胞はコード形成陽性であり、Ac-LDL の取  
込み、vWF, eNOS タンパクの発現はほぼ全ての細胞で認め  
られた。これらの性質は 8 回の継代培養、凍結融解後にも保  
持されていた。現在、ES 由来内皮細胞の in vivo での機能に  
関する解析中である。

O-15-3 機能性ペプチド配列の融合による新規血管新生調節タンパク質の設計

中村 真希子<sup>1</sup>, 三重 正和<sup>1</sup>, 中村 真人<sup>1</sup>, 小島 英理<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京工業大学大学院生命理工学研究科生命情報専攻, <sup>2</sup>東京医科歯科大学学生体材料工学研究所

【目的】生体内においては、様々な細胞が集合して複雑な組織を形作っている。このような生体内の細胞ネットワークを人工組織に再現するには、細胞の足場となりネットワーク形成のシグナルを導入する細胞外マトリックスタンパク質の役割が非常に重要である。よって、本研究では、血管新生における細胞ネットワーク構築をモデルとし、現在までに同定されている血管新生調節ペプチドを結合させた高機能細胞外マトリックスタンパク質を設計・構築することを目的とした。

【方法】エラスチン由来の繰り返しペプチドから成る安定構造中にラミニン由来の血管新生調節配列とフィブロネクチン由来の細胞接着性配列を含む融合タンパク質を設計し、大腸菌内で遺伝子工学的に発現させた。得られた融合タンパク質をコートしたプレート上に接着する細胞数を計測することにより、細胞接着能及び細胞増殖能の評価を行った。また、融合タンパク質を添加したMatrigel上に血管内皮細胞を播種し、血管新生マーカー遺伝子の発現をRT-PCR法にて評価した。

【結果と考察】設計した融合タンパク質は、フィブロネクチンと同等の細胞接着能・細胞増殖能を保持しており、同時に血管新生マーカーの発現も促進された。本研究で作製した融合タンパク質は、内部に組み込まれた機能性配列の特性をそれぞれ保持していることから、血管新生を調節できる高機能細胞外マトリックスタンパク質としての有用性が示された。

O-15-5 脱細胞化大動脈組織内の残存リン脂質除去によるミニブタ同種移植での効果

玉井 克明<sup>1</sup>, 染川 将太<sup>1</sup>, 湊谷 謙司<sup>1</sup>, 吉田 謙一<sup>1</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>, 森反 俊幸<sup>1</sup>, 永谷 憲彦<sup>1</sup>, 岸田 晶夫<sup>1</sup>, 中谷 武嗣<sup>1</sup>

<sup>1</sup>鈴鹿医療科学大学医学工学部臨床工学科, <sup>2</sup>国立循環器病センター, <sup>3</sup>先端医療振興財団, <sup>4</sup>東京医科歯科大学

【目的】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。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。移植後の石灰化は脱細胞化組織内の残存リン脂質に起因すると考えられるため、アルコール処理による残存リン脂質の除去を行った。ミニブタ同種移植実験での移植後3ヶ月の結果において、石灰化は僅かにしか認められなかった(昨年度発表)。今回は、6および12ヶ月におけるミニブタ同種移植実験においての石灰化、狭窄の有無について検討した。

【方法】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。パワーグラフト法を行うことで、組織内細胞を除去した。さらに、アルコール処理で残存リン脂質を除去した。同種ミニブタに下行大動脈置換移植した後、所定期間経過後に摘出し、組織学的に評価した。

【結果】移植後6ヶ月の組織を染色した結果、リン脂質を除去していない組織では石灰化が顕著に見られた。一方、脱細胞化組織の残存リン脂質を除去した組織では吻合部に石灰化が若干認められるが、その他の部位では見られなかった。また狭窄も見られなかった。さらに、移植組織の再細胞化の進行も認められた。現在、移植後12ヶ月の組織についても検討中である。

O-15-4 再生臓器の血管新生

P-197 永吉 実紀子<sup>1</sup>, 小山 博之<sup>1</sup>, 高戸 毅<sup>1</sup>, 田口 哲志<sup>1</sup>, 小林 尚俊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京大学医学部血管外科, <sup>2</sup>東京大学医学部口腔外科, <sup>3</sup>材料研究機構

【目的】再生臓器移植後の生体内での機能維持には、充分な酸素・栄養の供給・不要な代謝産物の除去が必要である。これらの物質の拡散輸送距離は100 $\mu$ m程度であり、それ以上の距離には血流が必要となる。よって、ある程度の大きさの再生臓器の生体内には、再生臓器の周囲・内部に血管を張り巡らせること、つまり再生臓器の血管新生が必要となる。この研究では、再生臓器の血管新生を促進する新しい材料を開発することを目的とする。

【方法】材料に必要な条件は(1)血管壁を取り巻く二次元構造(2)細胞接着活性部位を持つ(3)プロテアーゼによる消化可能構造を持つ(4)血管新生因子と結合可能。これに従い、我々は天然の細胞外マトリックスと人工の架橋剤を用いた材料を作成した。これをラット腹直筋筋鞘下に埋め込み、6日後に摘出しこの材料が生体内での血管新生効果を評価した。また、受精卵の無血管鞘に埋め込み、2日後に蛍光色素を静注し血管新生効果を評価した。

【結果・考察】マトリックスと架橋剤の比率が適切なものでは、血管新生因子非投与下の材料内でも組織学的に血管構築の増加、ピクセル属性カウント数増加、ヘモグロビン量の増加が認められた。さらにこの材料はbFGFと結合可能であり、bFGF投与下の血管新生が促進された。この結果は、この材料が生体内から材料内血管新生を誘導すると同時に、材料内部での血管化も促進する力を持つことを示している。

O-15-6 血管新生、血管構造安定化におけるアドレノメデュリンの役割

新藤 隆行

信州大学大学院医学研究科臓器発生制御医学講座

アドレノメデュリン(AM)は、多彩な生理活性を持つペプチドで、循環調節や心血管病態に関与している。我々は、AMノックアウトマウス(AM<sup>-/-</sup>)は、血管発育不全や、著明な浮腫によって胎生致死である事から、AMが血管新生作用を有することを明らかにした。そこで、AMの血管再生療法への応用を考え、成体におけるAMの血管新生作用を検討した。マウスの動脈結紮による下肢虚血モデルにおいて、AM投与群では、新生が亢進し、血流回復が亢進したが、AMヘテロノックアウトマウス(AM<sup>+/-</sup>)や、AM競合阻害薬のAM22-52投与群では、血管新生が減弱していた。AM投与群では、虚血肢のVEGFが亢進したが、逆にAM<sup>+/-</sup>では発現が低下していた。また、の外因性投与により、AM<sup>-/-</sup>の血管新生減弱は回復したが、GFR-2ノックアウトマウスでは回復が認められなかった。内皮細胞と線維芽細胞の共培養系による検討では、AMとAM同時投与により、管腔形成の亢進が認められた。AMは、細胞におけるVEGF発現を亢進させると共に、AMとVEGF同時投与により、Akt活性化の増強が認められた。以上のことから、AMの血管新生作用の一部は、VEGF-Flk-1-Akt系を介していること、更にAM<sup>+/-</sup>では、その他の血管新生因子、成長因子の発現変化が確認されることから、VEGF以外の因子投与も示唆された。AMの血管再生、血管構造安定化は、新たな血管再生療法への応用が期待される。