

2007年10月28日～31日. J Artif
Organs 2007; 36(2): S-14.

- 34) 山崎健一, 寺田堂彦, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養. 第10回日本組織工学会, 東京, 2007年11月8～9日. 第10回日本組織工学会抄録集 2007; 62.
- 35) 近藤英雄, 北孝之, 寺田堂彦, 山崎健一, 橋本成広, 藤里俊哉. 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 豊中. 2007年11月26～27日. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 286.
- 36) 奈良雅尚. 山崎健一. 寺田堂彦. 澤田和也. 近藤英雄. 橋本成広. 藤里俊哉. ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第29回日本バイオマテリアル学会大会. 豊中. 2007年11月26～27日. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 335.
- 37) Fujisato T, Yoshida K, Terada D, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Tissue-derived Scaffold for Aortic Root Reconstruction. Tissue engineering international and regenerative medicine society - Asia Pacific Chapter Meeting 2007. Tokyo, Japan. 2007年12月3日～5日. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract 2007; 124.
- 38) Fujisato T, Terada D, Sawada K, Yoshida K, Kishida A, Miyamoto K, Niwaya K, Nakatani T, Kitamura S. Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration. 1st Asian Biomaterials Congress. Tsukuba, Japan. 2007年12月6日～8日. 1st Asian Biomaterials Congress Abstract, 2007; 112.
- 39) 林宏行, 山崎健一, 宇戸禎仁, 小林裕之, 江橋具, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 培養筋管細胞の収縮動態の定量評価. 第20回バイオエンジニアリング講演会. 東京, 2008年1月25～26日. 第20回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 2008; No.07-49: 297-8.
- 40) Fujisato T, Terada D, Funamoto S, Minatoya K, Kishida A, Yamaoka T, Nakatani T, Kitamura S. Tissue Regeneration by Decellularized Biological Scaffold Prepared by Detergent-free Treatment. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine 5th Symposium. Phoenix, USA. 2008年2月14日～18日. Biologic Scaffold for Regenerative

Medicine, 5th Symposium 2008; 12.

41) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 湊谷謙司, 山崎健一, 林 宏行, 江橋 具, 小林尚俊, 岸田晶夫, 山岡哲二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発. 第 11 回日本異種移植研究会. 吹田. 2008 年 2 月 23 日. 第 11 回異種移植研究会プログラム・抄録集 2008; 19.

42) 藤里俊哉, 寺田堂彦, 湊谷謙司, 山崎健一, 林 宏行, 近藤英雄, 江橋 具, 小林尚俊, 岸田晶夫, 山岡哲二, 中谷武嗣, 北村惣一郎. 生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生. 第 36 回人工心臓と補助循環懇話会. 湯沢. 2008 年 3 月 7 日～8 日. 第 36 回人工心臓と補助循環懇話会プログラム・抄録集 2008; 78.

43) 寺田堂彦, 澤田和也, 緒方裕之, 平工香織, 鎌田和加子, 吉田謙一, 船本誠一, 藤里俊哉, 岸田晶夫, 山岡哲二, 中谷武嗣. 脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生. 第 7 回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008 年 3 月 13～14 日.

44) 奈良雅尚, 山崎健一, 寺田堂彦, 澤田和也, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. ポ

リプロピレン繊維-コラーゲン複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養. 第 7 回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008 年 3 月 13～14 日.

45) 山崎健一, 寺田堂彦, 奈良雅尚, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 脱エラスチン組織-コラーゲン複合体を足場とした C2C12 細胞の 3 次元培養. 第 7 回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008 年 3 月 13～14 日.

46) 林 宏行, 山崎健一, 小林裕之, 宇戸禎仁, 近藤英雄, 橋本成広, 藤里俊哉. 電界に対する培養筋管細胞の異方性. 第 7 回日本再生医療学会総会. 名古屋. 2008 年 3 月 13～14 日. 日本再生医療学会誌 2008; 7(Suppl): 286.

F-3. 新聞報道等

1) 他人の頭皮で毛髪再生. 朝日新聞. 2008 年 2 月 1 日.

G. 知的財産権の出願状況

G-1. 特許取得

1) 藤里俊哉, 染川将太, 江橋 具, 戸川祐一, 中谷武嗣, 宇田川春英. 無針注射器を用いた細胞播種法. 特願 2007-47829, 2007 年 2 月 27 日

- 2) 岸田晶夫, 藤里俊哉, 木村 剛, 船本誠一. 脱細胞処理液、脱細胞化組織の調製方法、移植片、及び培養部材. 特許出願2007-217099. 2007年8月23日.
- 3) 岸田晶夫, 木村 剛, 南 広祐, 藤里俊哉. 機能性DNAの製造方法、形質転換体及び疾患治療剤. 特許出願2007-263704. 2007年10月9日.
- 4) 藤里俊哉, 岸田晶夫. 船本誠一, 中谷武嗣, 北村惣一郎, 超高静水圧印加による移植用生体組織の処理方法. 特許第 4092397 号、2008 年 3 月 14 日.

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

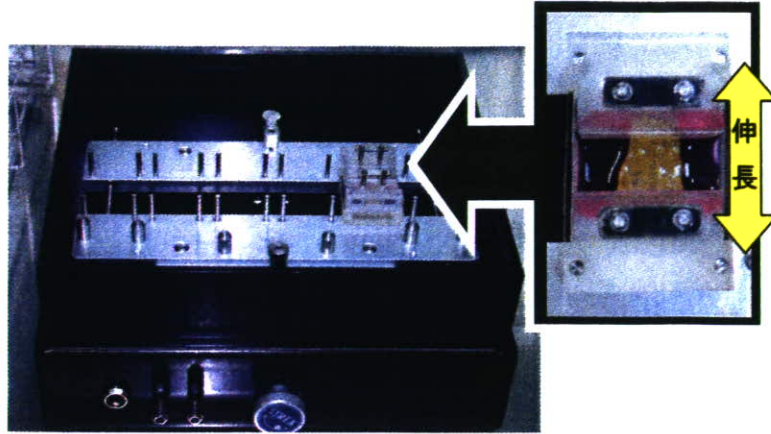
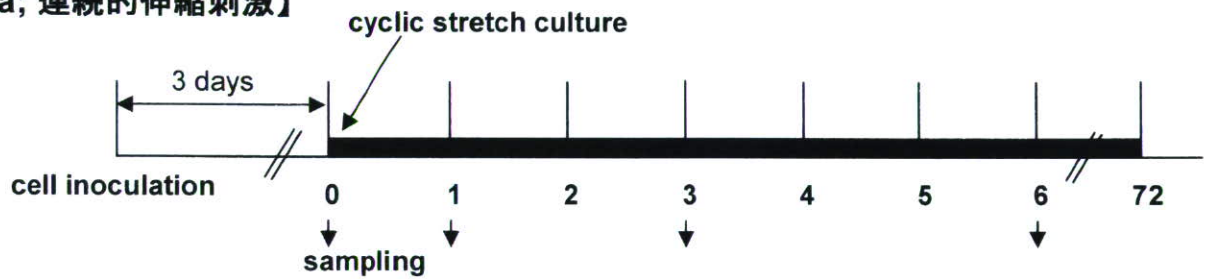


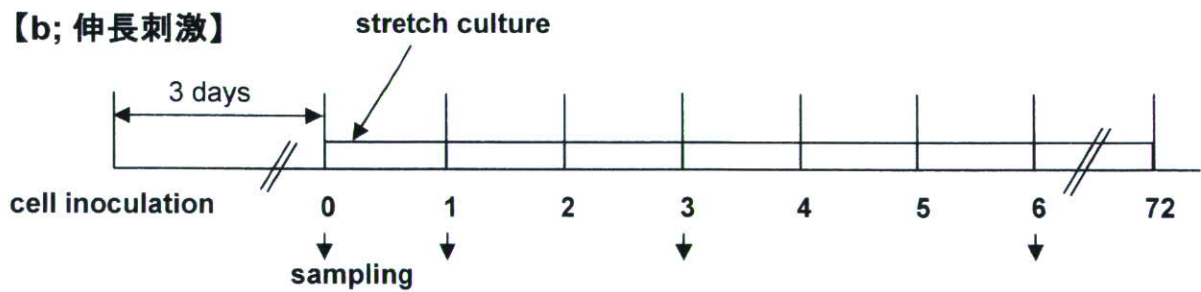
図 1. 伸長あるいは伸縮刺激用装置外観.

細胞を播種し、静置培養したスキャフォールドの両端をクリップで挟んで伸長刺激あるいは伸縮刺激を与えた.

【a; 連続的伸縮刺激】



【b; 伸長刺激】



【c; 断続的伸縮刺激】

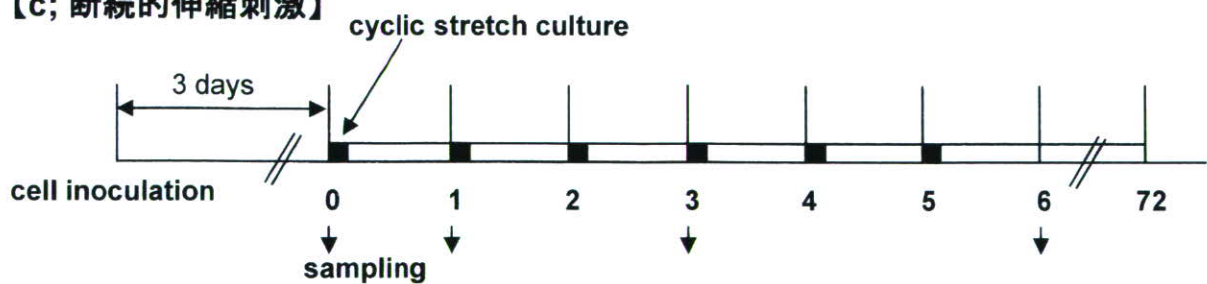


図 2. 伸長刺激と伸縮刺激の刺激付与とサンプル取得.

細胞播種後、3日間静置培養して、伸長刺激あるいは伸縮刺激を与えた。サンプルは、刺激開始直前を0時間とし、1、3、6時間後に取得した。

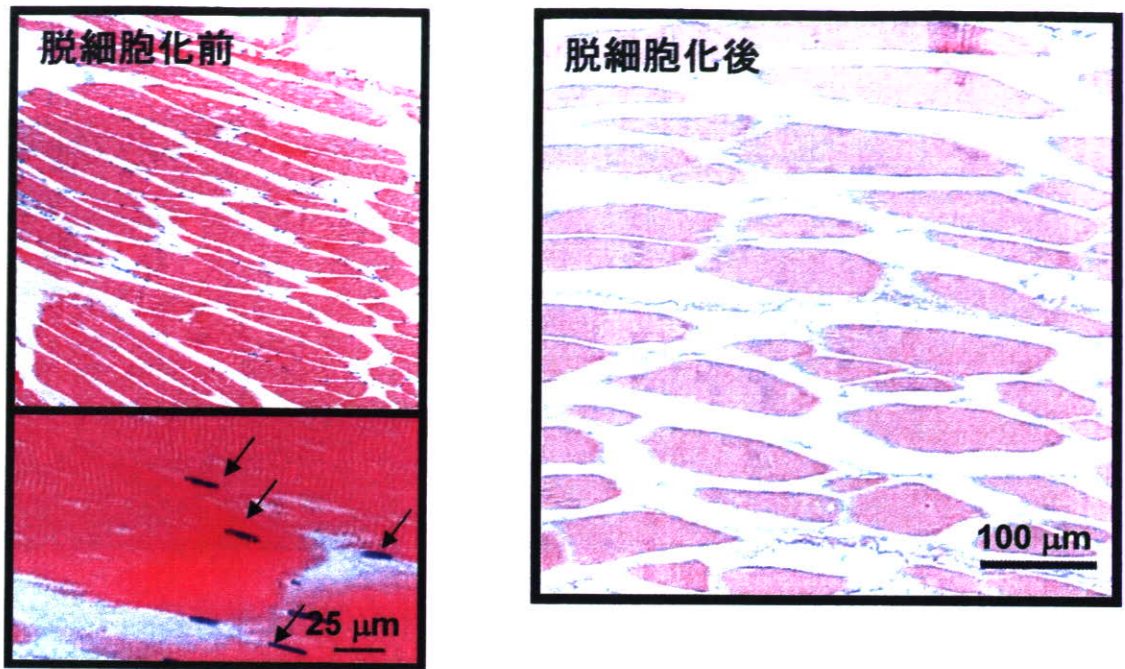


図 3. 作製したスキャフォールドの HE 染色
 脱細胞化前は濃青色に染色された細胞核が観察されたのに対し(左)、脱細胞化後は脱核されているのが確認された(右)。

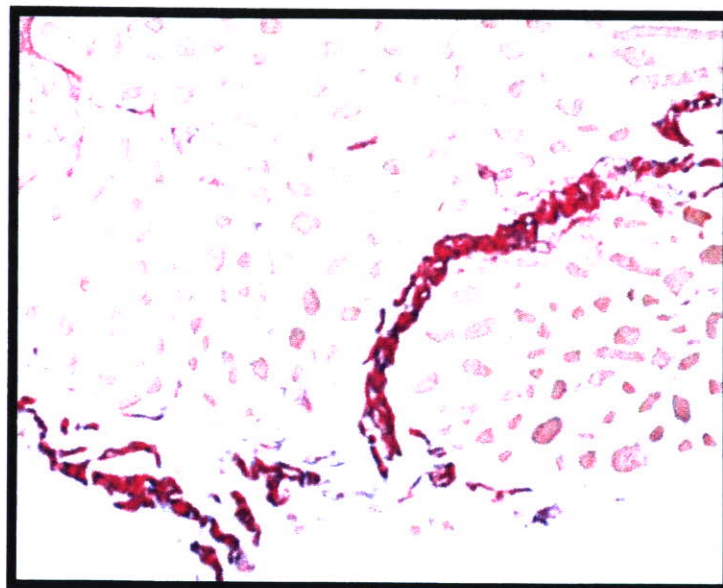


図 4. 作製したスキャフォールドの EVG 染色
 脱細胞化骨格筋スキャフォールドの内部には、主にコラーゲンと考えられる細胞外マトリクスが網目状に残留していた(紫色部分)。

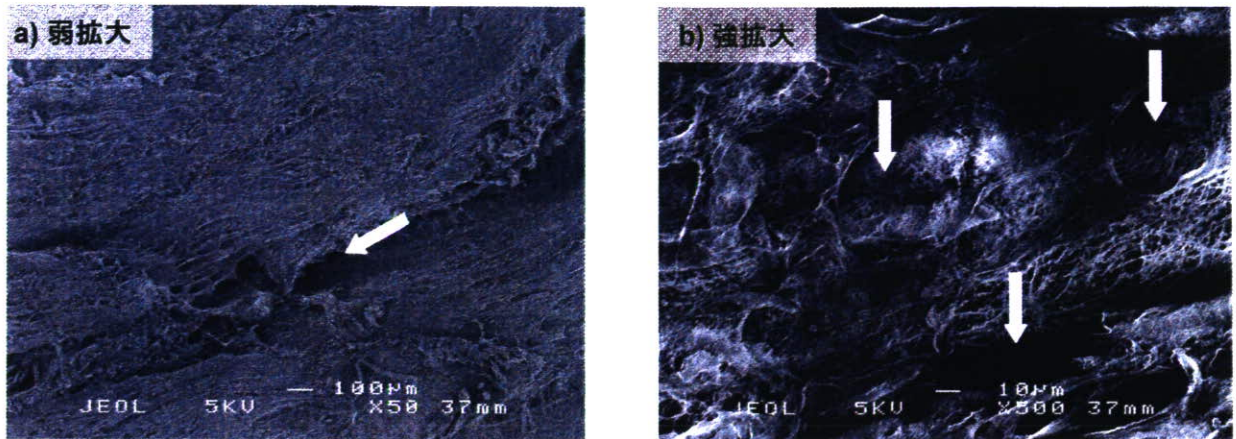


図 5. 脱細胞化スキャフォールドの走査型電子顕微鏡による観察.
スキャフォールドの骨格間隙はかなり小さかったものの、ところどころ $50\ \mu\text{m}$ 以上の間隙があった.

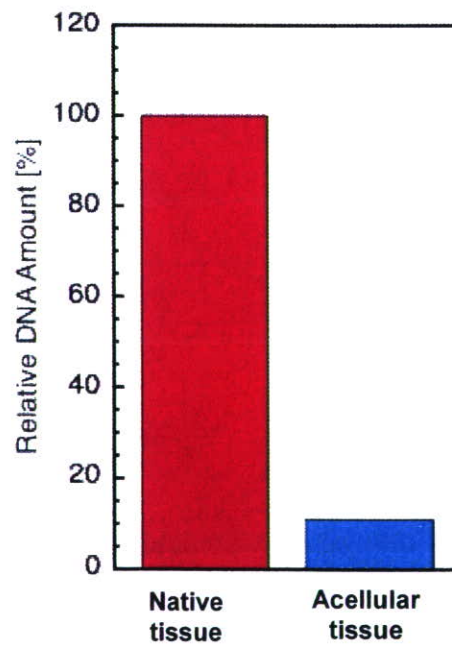


図 6. 脱細胞化処理前後の組織内 DNA 量.
脱細胞化処理後は、処理前の 10% 以下にまで DNA 量が減少していた.

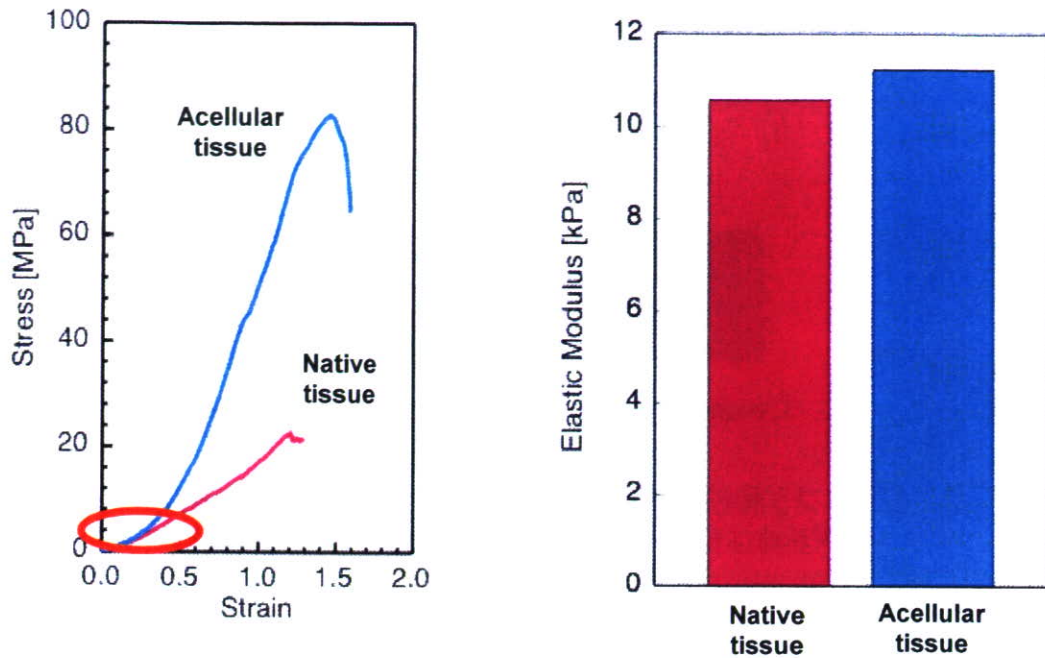


図 7. 脱細胞化筋スキャフォールドの力学特性評価

a) 応力-ひずみ曲線; b) 弾性率。脱細胞化処理の前後で応力-ひずみ曲線の弾性領域 (a図赤枠) から算出した骨格筋の弾性率には、大きな変化は認められなかった。

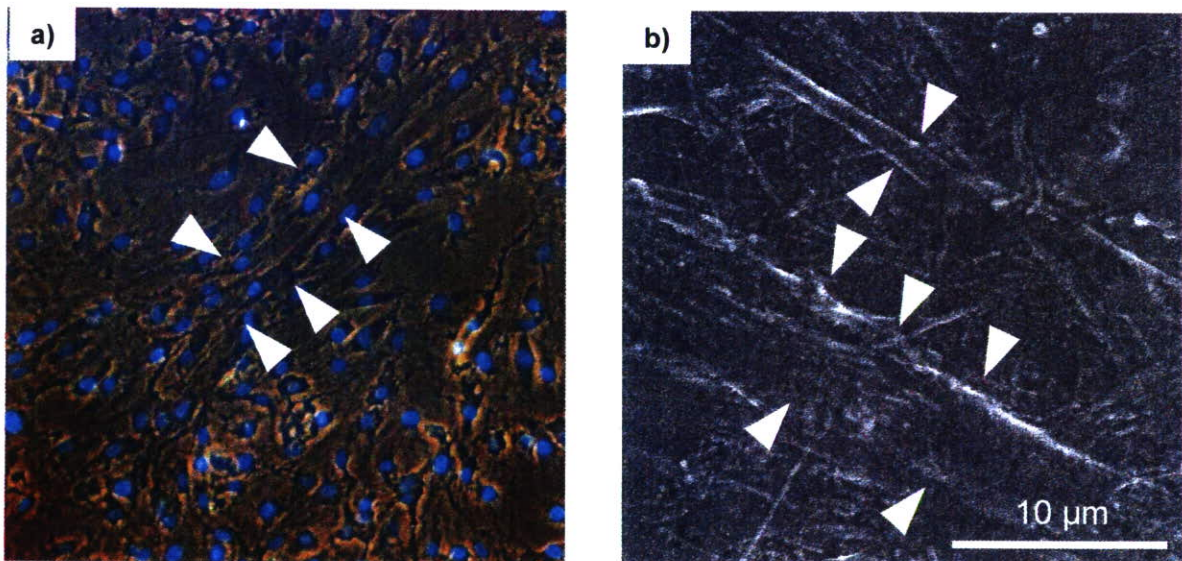
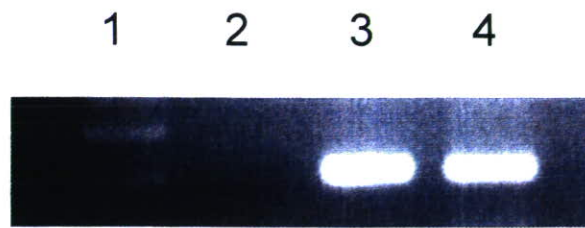


図 8. ブタ骨格筋由来筋芽細胞の形態変化による分化能の確認

a) 筋芽細胞の核染色像; b) 筋芽細胞の走査型電子顕微鏡像。筋芽細胞に分化誘導培地を添加して 2 週間後、細胞融合をおこして筋管細胞様の形態を示した(矢印)。



1; marker, 2; 線維芽細胞, 3; 骨格筋組織, 4; 筋芽細胞

図 9. ブタ骨格筋由来筋芽細胞の分化能の確認(RT-PCR).
筋芽細胞は筋細胞特異的タンパク質であるデスミンを発現していた.

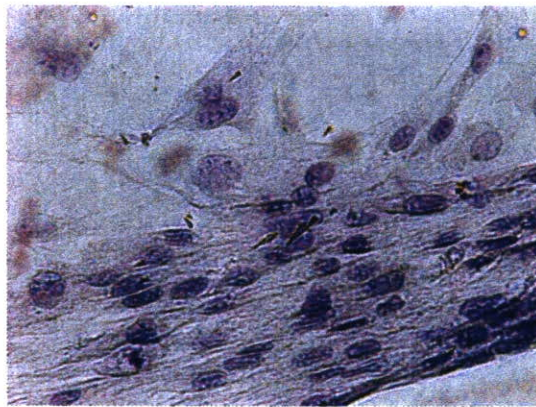


図 10. ブタ骨格筋由来筋芽細胞の分化能の確認(免疫染色).
分化誘導し、形態が変化した筋芽細胞はデスミン陽性であった.

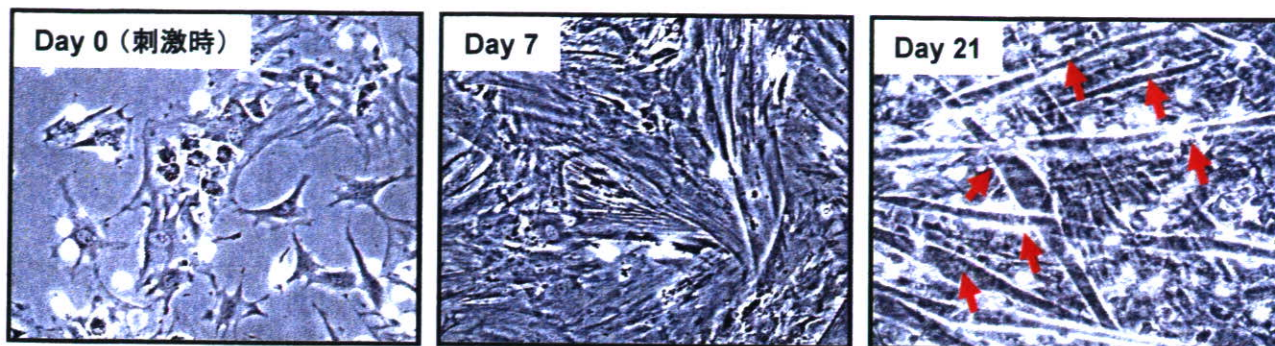


図 11. ラット骨髄細胞の筋細胞への分化能の形態学的確認

培養骨髄細胞に 5-azacytidine 添加培地による分化誘導を 24 時間行い、培養を継続すると、3 週間後には筋管細胞様の細胞形態(矢印)を示した。

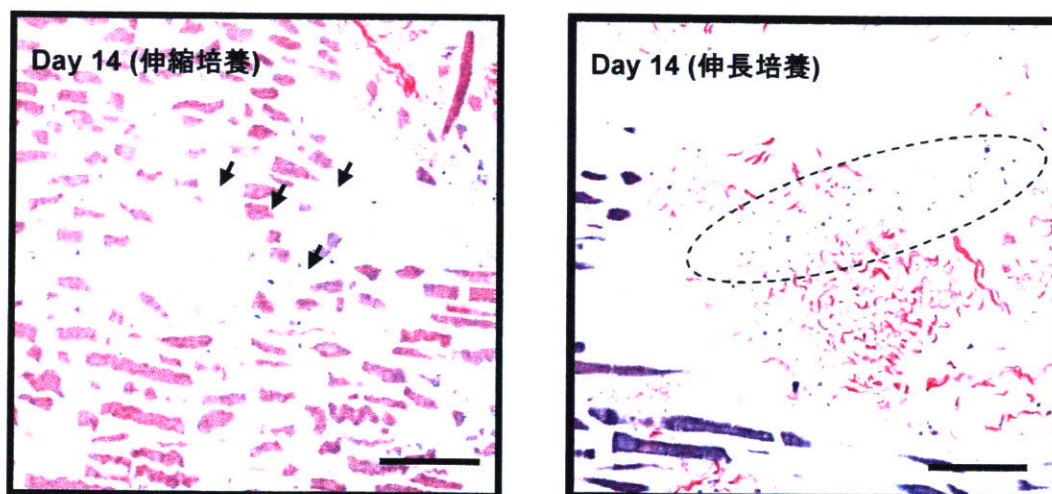


図 12. ブタ筋組織由来筋芽細胞の伸縮培養および伸長培養

筋芽細胞をスキヤフォールドに播種して 2 週間の伸縮培養あるいは伸長培養を行っても、いずれの条件でも細胞は丸い形状を保持したままで(矢印あるいは枠内)、これらの物理的的刺激による筋細胞への分化への影響は認められなかった。Bars; 200 μ m

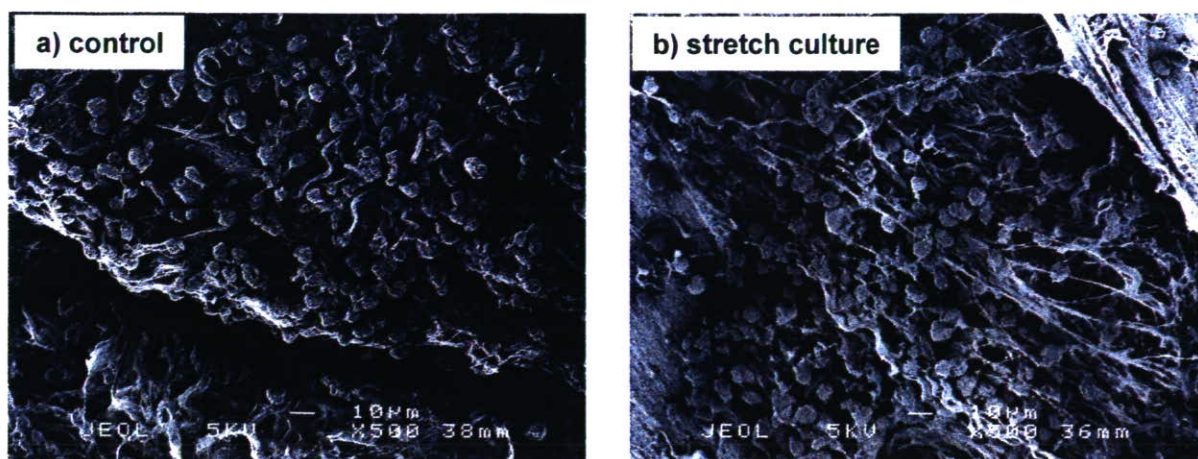


図 13. 株化筋芽細胞 (C2C12) への伸縮刺激 (刺激開始から 8 日後の走査型電子顕微鏡像). a) control. b) 伸縮刺激群. 刺激することにより, 細胞外マトリクスの分泌量が増加する傾向が見られたものの, 細胞の形態に変化はなかった.

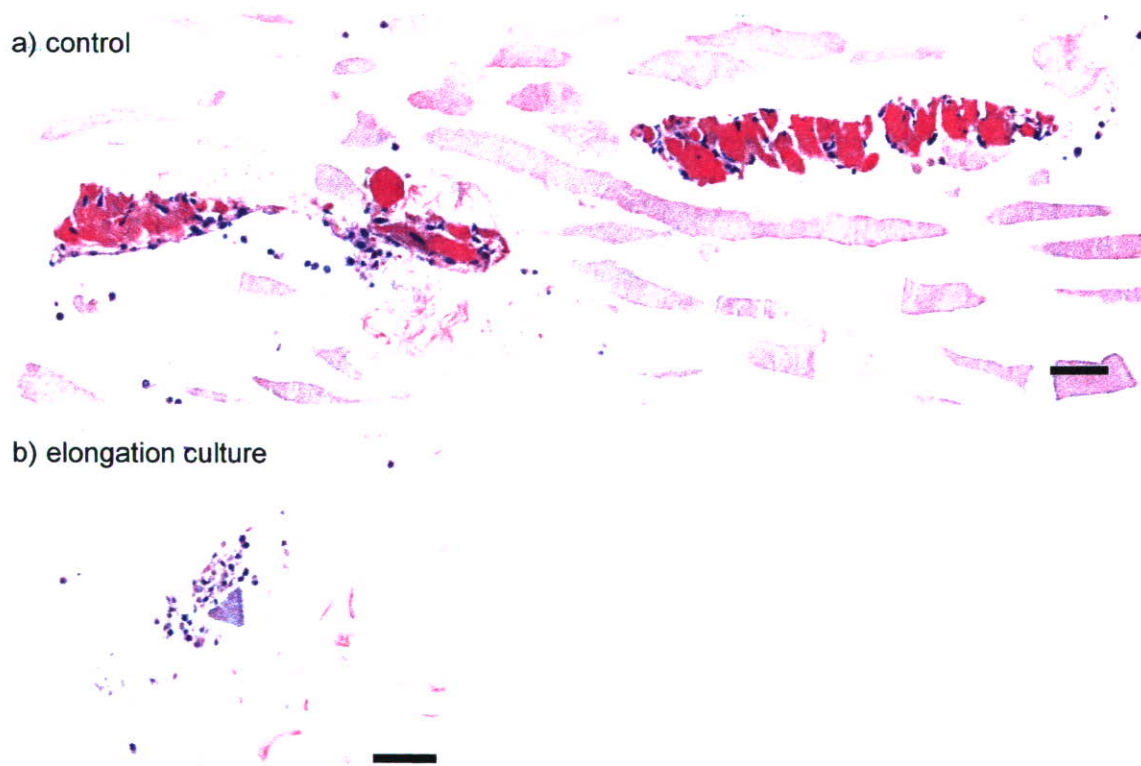
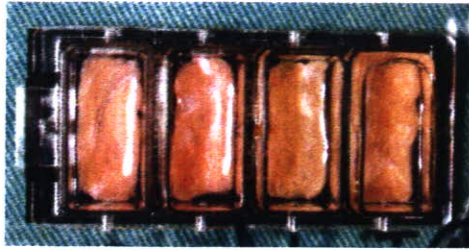


図 14. 株化筋芽細胞 (C2C12) への伸長刺激 (刺激後 3 日目の HE 染色像). a) control. b) 伸長刺激群. 刺激の有無にかかわらず, 筋芽細胞はスキヤフォールドの伸長方向に水平な向きが横断面となるような向きに筋細胞様の形態を示した. したがって, 刺激が細胞に与える効果は認められなかった. Bars; 50 μ m.

a) Day 0



b) Day 3

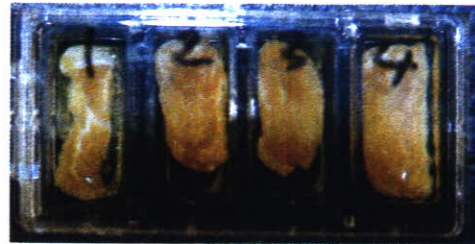


図 15. ラット骨髄細胞のスキヤフォールドを用いた静置培養

スキヤフォールドに骨髄細胞を播種して3日間培養すると、細胞は良好に増殖し、スキヤフォールドを牽引したため、スキヤフォールドが収縮した。

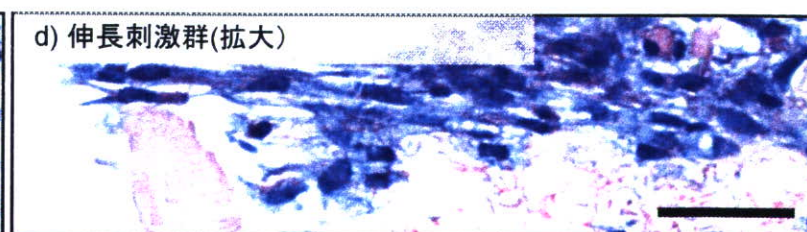
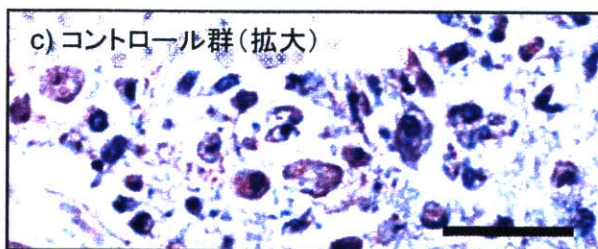
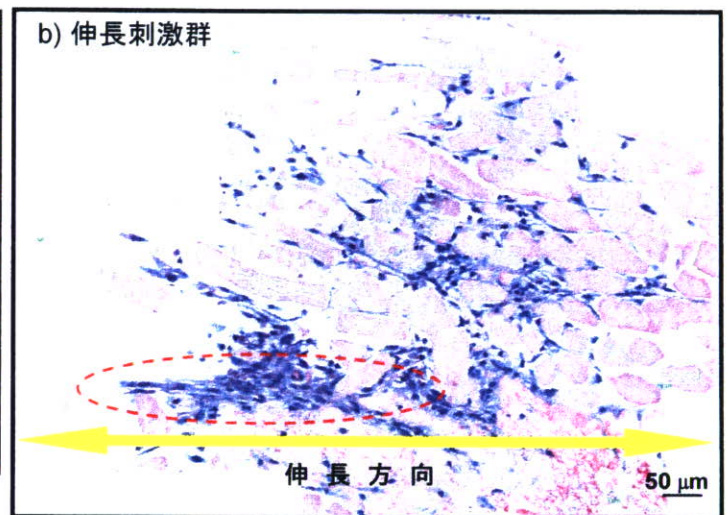
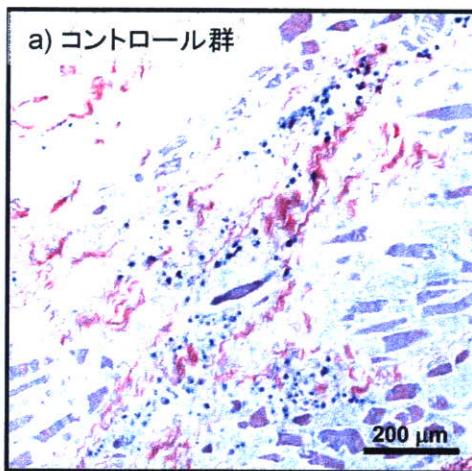


図 16. ラット骨髄細胞のスキヤフォールドを用いた伸長培養

スキヤフォールドに骨髄細胞を播種して3日間静置培養し、その後伸長培養による物理的的刺激を与えると、3日後には細胞がスキヤフォールドの伸長方向と並行して、一部では細胞融合した筋管細胞様の形態が認められた(b 枠内, d)。

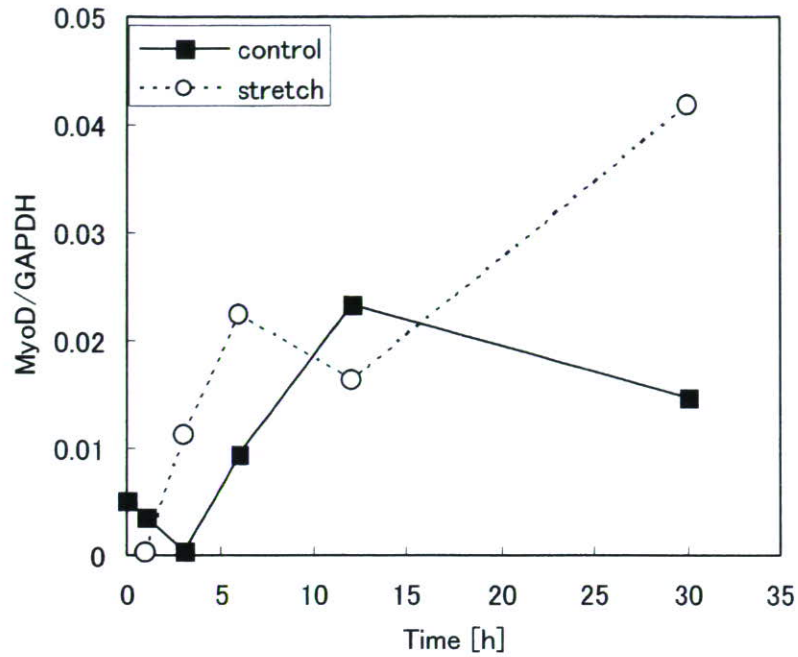


図 17. 間葉系幹細胞の伸縮刺激による筋分化マーカー発現量の変化. いずれの場合にも, 発現量は経時的に増加したものの, 伸縮刺激を与えると, コントロール群よりも発現量が高い傾向が見られた.

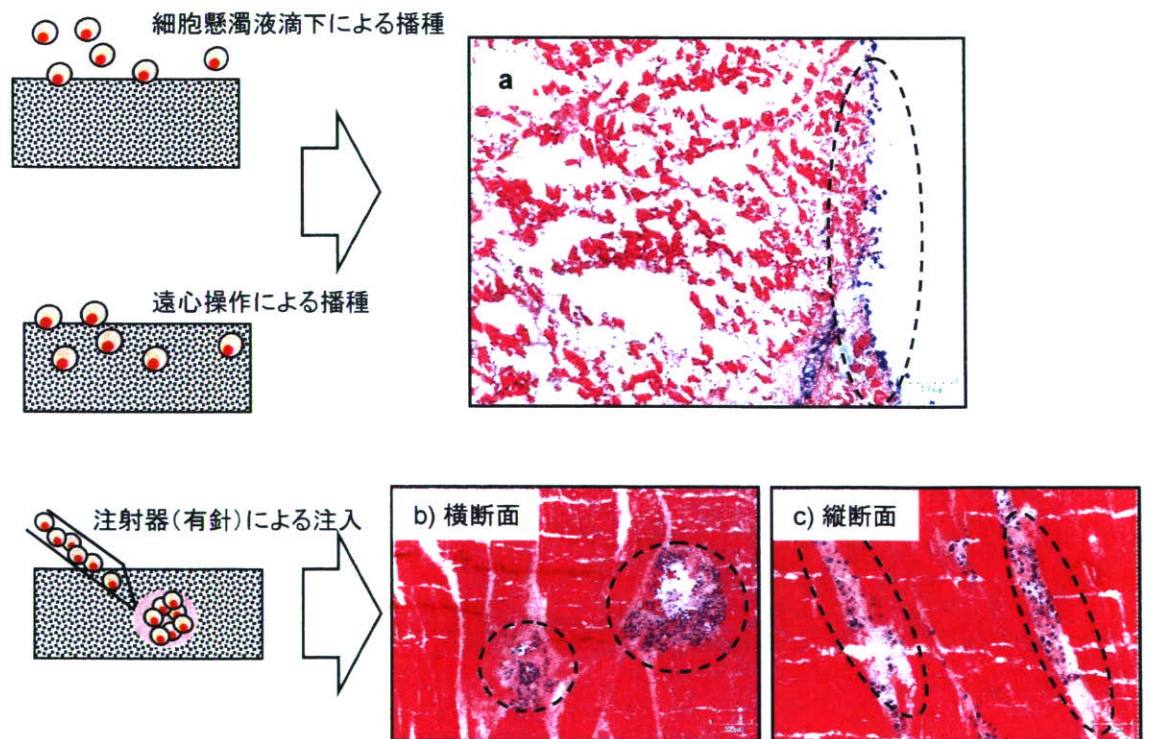


図 18. 通常のスキャフォールド細胞播種法

細胞懸濁液を滴下したり遠心操作による積極的に播種しても骨格が密なスキャフォールドでは内部まで細胞を接着させることは困難であった(a). また注射器を用いて細胞を注入するとスキャフォールド内で細胞塊が形成され, スキャフォールドへの損傷も大きかった(b,c).

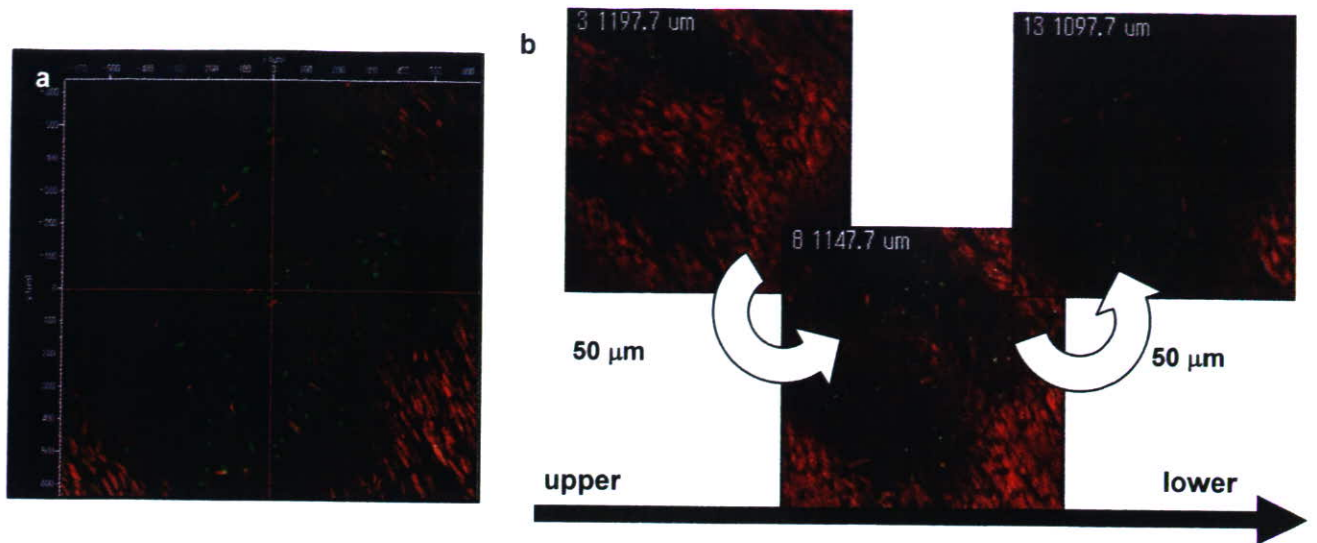


図 19. 無針注射器を用いた細胞播種後のスキャフォールド内部観察

細胞の生死染色を行い、スキャフォールド内部の細胞を観察したところ、緑色に染色された生細胞が多数観察された (a)。また、無針注射器によりスキャフォールド内に三次元的に細胞を散在させることができた (b)。(赤く細長く染色された部分はスキャフォールド骨格)

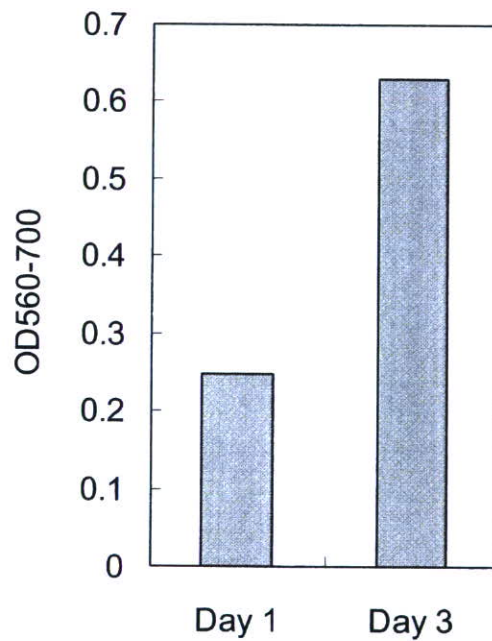


図 20. 無針注射器を用いた細胞播種後の細胞増殖能

細胞播種後、スキャフォールド内部で細胞は良好に増殖していることが確認された。

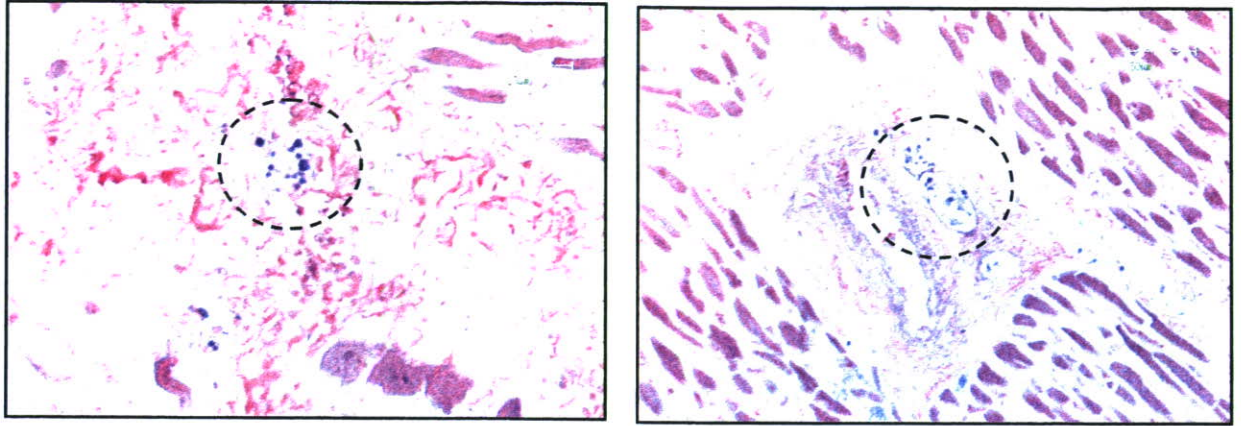


図 21. 長期培養後のスキヤフォールド内部細胞観察

厚さ 3 mm のスキヤフォールドに細胞を播種し, 1 ヶ月培養した後, 断続切片を作製して HE 染色を行ったところ, 細胞はさまざまな深さに散在して生存していた(写真は深さ 350 μm).



図 22. 無針注射器を用いた組織への細胞注入

正常マウスに GFP 遺伝子導入細胞を注射し, 24 時間後に組織を観察したところ, 組織内に緑色に発光する細胞が散在して定着しているのが確認された.

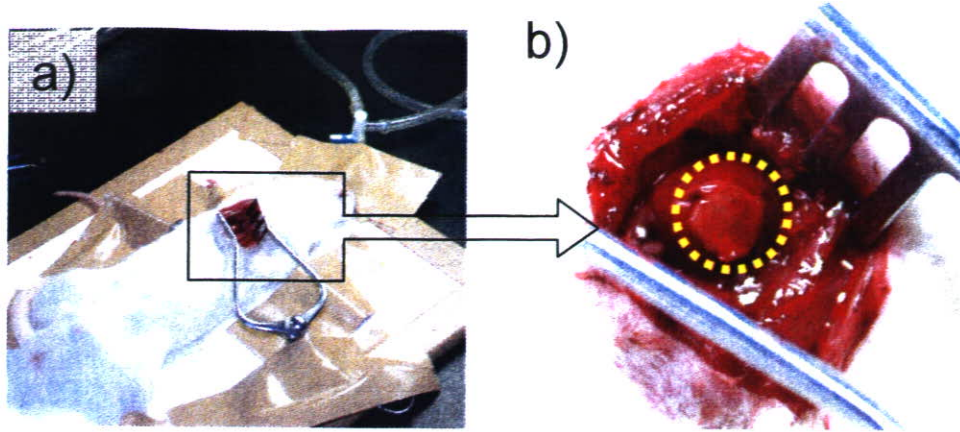


図 23. ラット心臓表面へのスキヤフオールドの移植.
 a) 手術のため開胸されたラット. b) 心臓表面に移植されたスキヤフオールド (黄色の囲み線).
 スキヤフオールドは三角形なので、その頂点を心筋との縫合部とした.

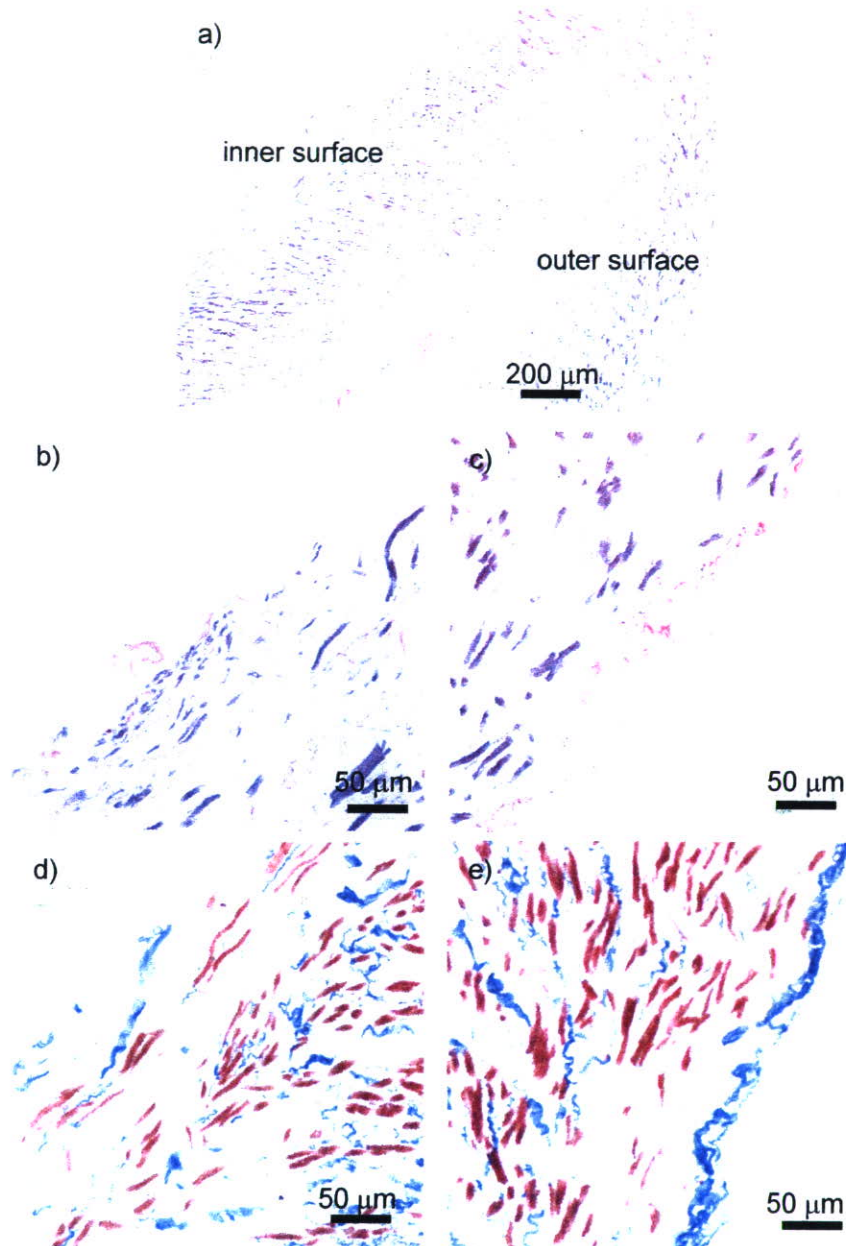


図 24. 脱細胞化心筋スキヤフオールドの組織染色像.
 a~c; HE 染色. d~e; Masson's Trichrome (MTC)染色. a; スキヤフオールド断面全体像. a; スキヤフオールド断面全体像. b, d; 心筋内腔側, c, e; 心筋外壁側. 心臓の外壁側はコラーゲン性の膜が覆っていた(HE染色, 桃色; MTC染色, 空色) のに対し、内壁はほとんど結合繊維は存在していなかった.

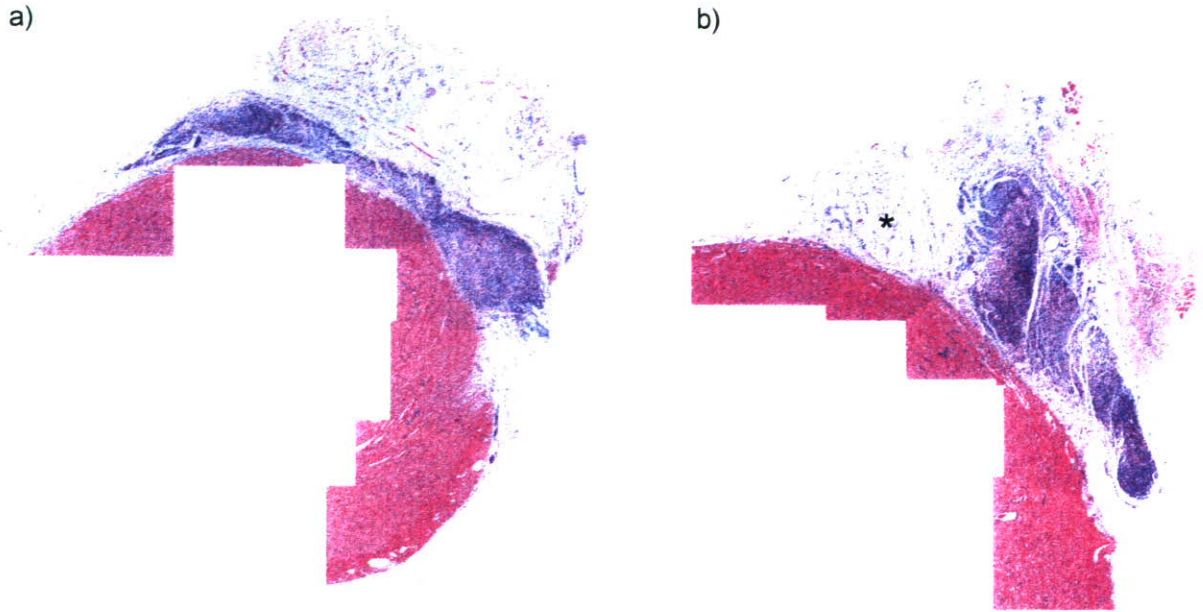


図 25. 移植スキャフォールド表面特性と心筋との親和性.

スキャフォールドの心臓内壁側をホスト心臓と密着させると、移植後 4 週間後、スキャフォールドは良好に定着した。一方、外壁側を密着させた場合には、ホスト心臓から離れてコラーゲンなどの結合組織が間を埋めた (b, *部分)。

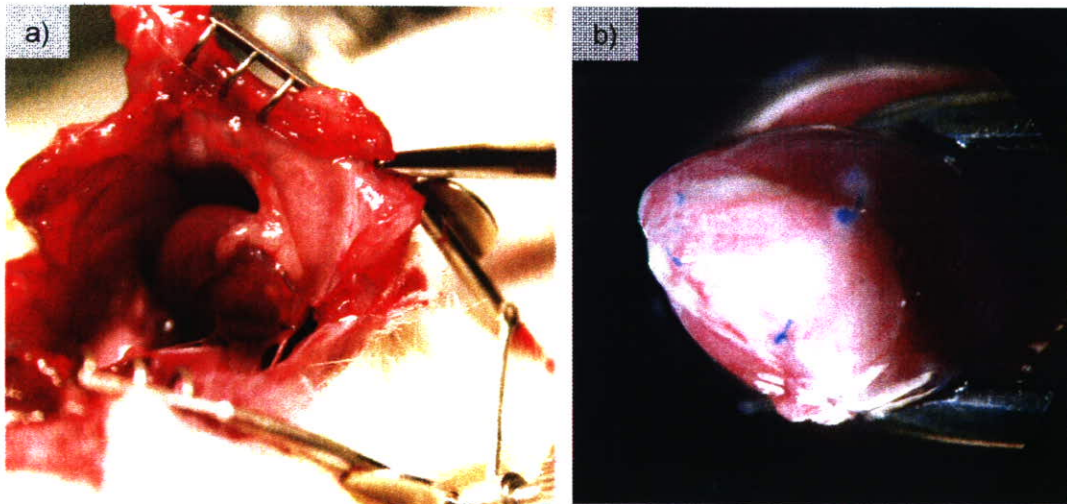


図 26. 心臓摘出時の様子 (4 週間目).

a, ラット胸腔内での心臓; b, 摘出した心臓のスキャフォールド移植部. 心臓のスキャフォールド移植部は通常の癒着が見られたが、心機能には影響がないと考えられる程度であった。

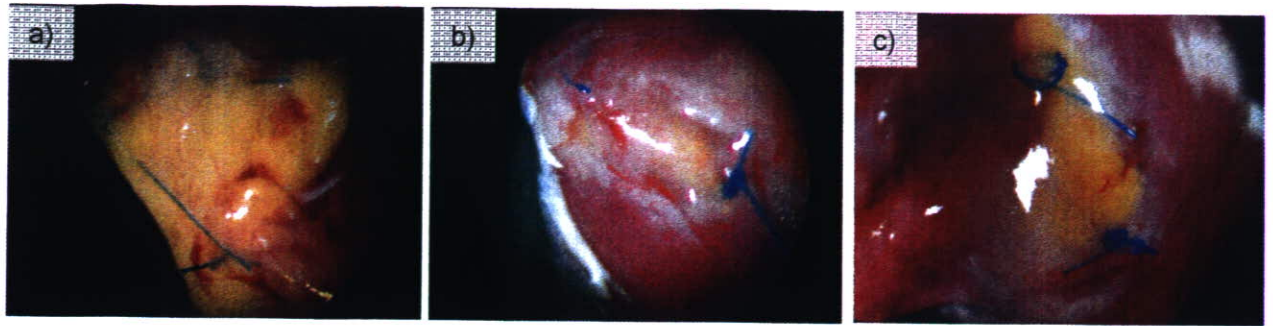


図 27. 心臓摘出時のスキヤフォールド外観.

a, 2 weeks; b, 4 weeks; c, 12 weeks. 心臓に移植したスキヤフォールドの外観はいずれの摘出時でも、ほぼ同様であった。すべての場合に、スキヤフォールド表面や結合組織に毛細血管が侵入しているのが観察された。

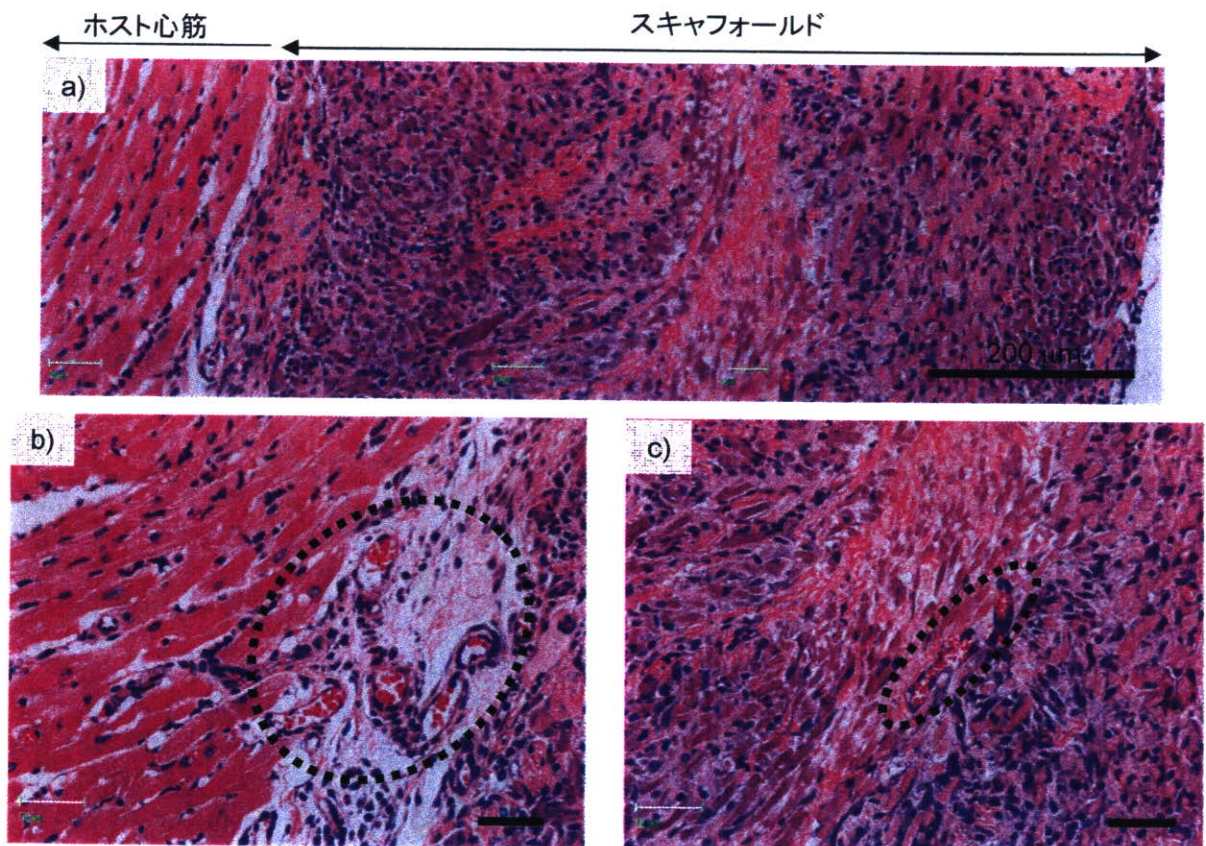


図 28. 移植後 2 週目の組織の HE 染色像.

a, スキヤフォールド全体横断面; b, ホスト心筋との接触部; c, スキヤフォールド中心部. スキヤフォールドに大量の細胞が侵入していたが、中心部分にはまだ及んでいなかった。心臓との密着面やスキヤフォールド中心部の細胞浸潤の先頭には毛細血管が観察された。

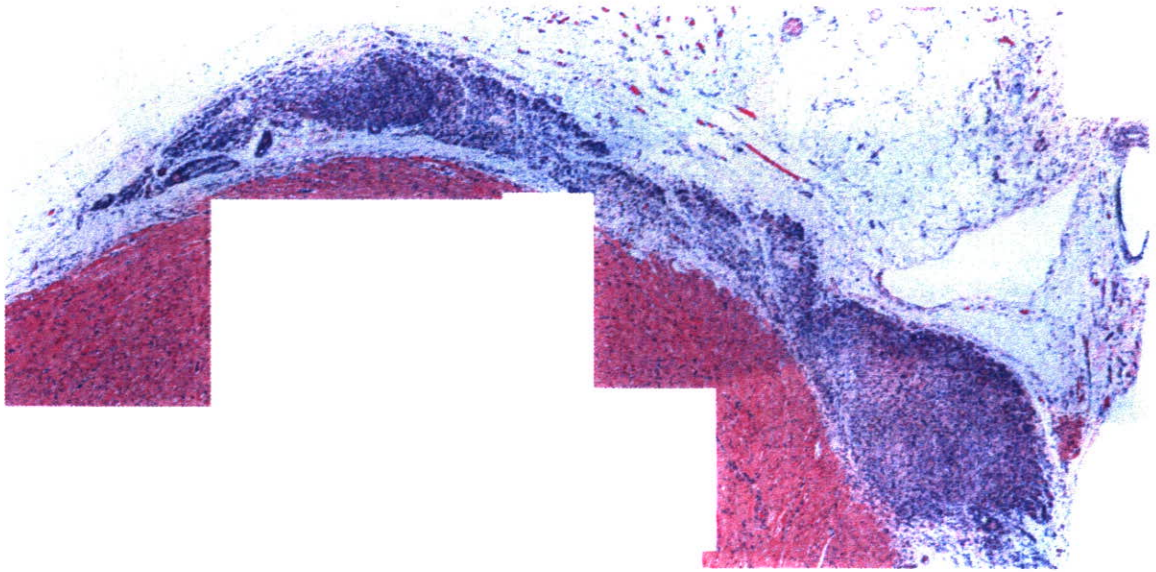


図 29. 移植後 4 週目の組織の HE 染色像.

スキャフォールド全体に細胞の浸潤が認められたものの、毛細血管の量は 2 週目の組織と比較すると減少していた。

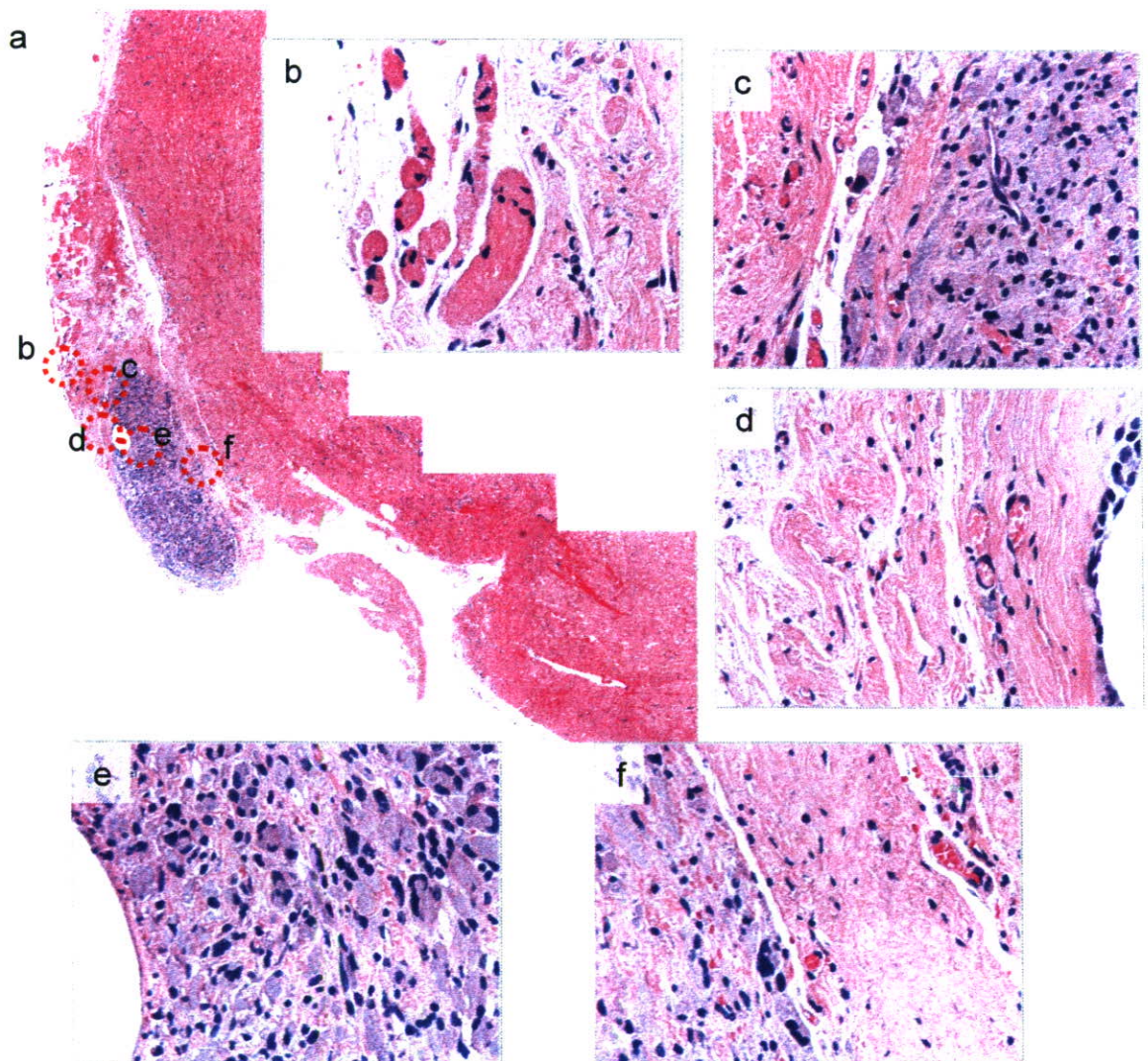
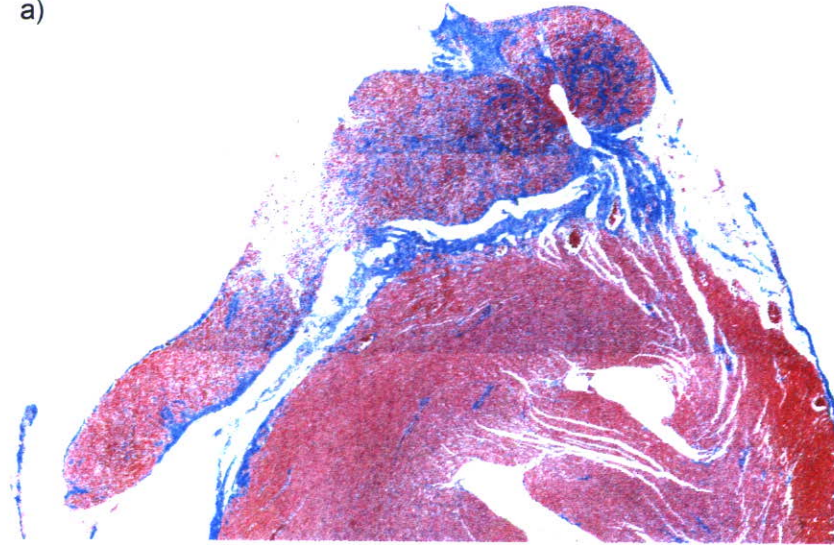


図 30. 移植後 12 週目の組織の HE 染色像.

a, スキャフォールド全体横断面; b~f, スキャフォールド内部および周辺部の浸潤細胞. スキャフォールドに浸潤している細胞は、移植後初期の細胞と比べるとさまざまな種類の細胞が観察された. また、カプセル化のようにスキャフォールド周囲を覆うコラーゲン様の組織が観察された.

a)



b)

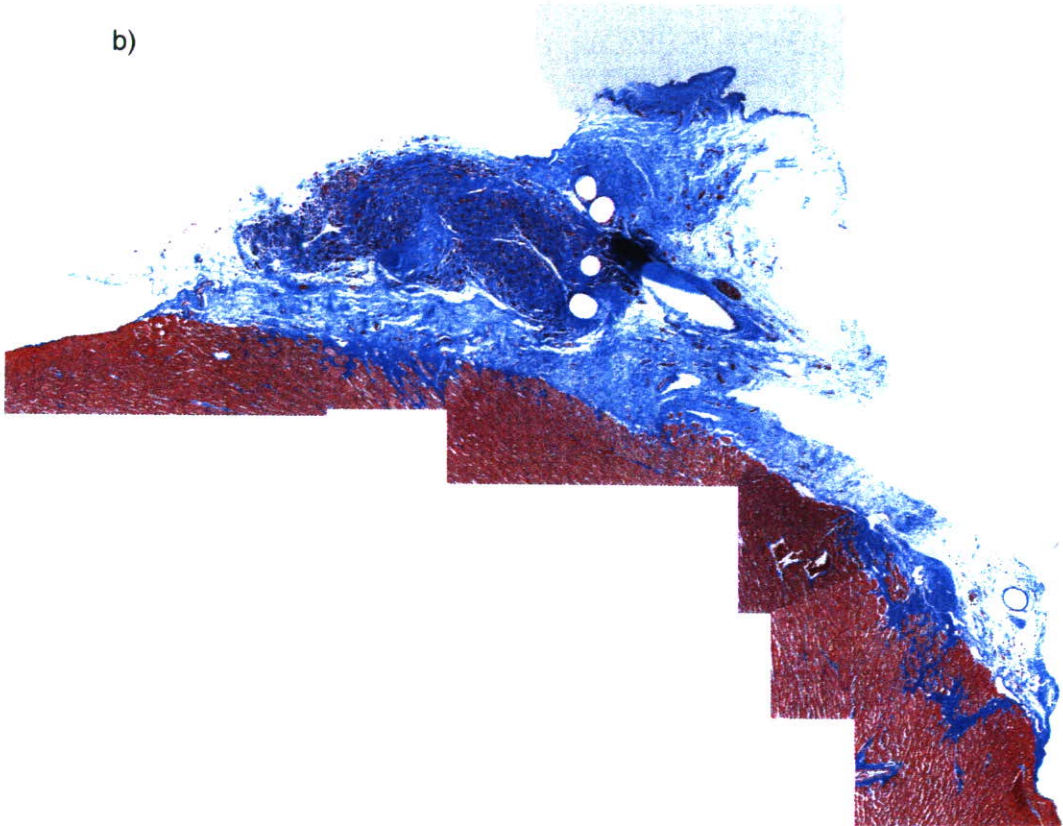


図 31. スキャフォールド周辺結合組織量の変化.
a, 2 weeks; b, 12 weeks. 移植後 2 週目では、スキャフォールド周囲の結合組織は少なかったものの、期間が長くなると厚みを増すことがわかった。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山岡哲二 木村良晴 藤里俊哉	医療用バイオベ ースマテリアル	木村良晴 ・小原仁 実 監修	バイオベ ースマテリア ルの新展開	シーエ ムシー 出版	東京	2007	187-197
藤里俊哉 北村惣一郎	心臓弁	筏 義人 監修	再生医療工 学の技術	シーエ ムシー 出版	東京	2007	142-147

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ehashi T, Kamata W, Funamoto S, Yoshida K, Kishida A, Nagaya N, Fujisato T	Preparation of a decellularized tissue as a scaffold for reconstructing skeletal muscle in vitro	TERMIS-EU Chapter Meeting 2006 Abstract Book	—	206	2006
江橋 具、鎌田和加子、船本誠一、吉田謙一、岸田晶夫、中谷武嗣、永谷憲歳、藤里俊哉	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	人工臓器	35(2)	S-131	2006
船本誠一、江橋具、菊池正博、小林泰彦、藤里俊哉、山岡哲二、岸田晶夫	Co60によるγ線を用いた生体由来組織の脱細胞化処理	人工臓器	35(2)	S-130	2006
戸川祐一、江橋具、吉田謙一、藤里俊哉、大場謙吉、中谷武嗣	バイオリアクターを用いた血管 scaffold への細胞播種	第17回バイオフロンティア講演会講演論文集	No.06-46	93-94	2006
江橋 具 鎌田和加子、船本誠一、吉田謙一、岸田晶夫、中谷武嗣、永谷憲歳、藤里俊哉	再生骨格筋作製を目的とした間葉系幹細胞の伸長培養	第28回日本バイオマテリアル学会大会予稿集	—	173	2006
江橋 具、染川将太、藤里俊哉	注射器を用いる新規細胞播種法の開発	ライフサポート学会専門研究会 細胞制御工学研究会	—	—	2007