

図3 異物に対する免疫応答反応

ンは、B細胞にも作用し、B細胞の増殖や分化を促すとともに、この細胞による抗体産生を誘導する。また、増殖・分化の過程で、機能細胞にまで成熟しなかった一部のリンパ球は、記憶細胞として生存しつづける。つぎに同じ抗原が体内に侵入した際には、この記憶細胞から成熟して抗体が産生されるために、一度目よりも速やかに免疫応答が起こる。また、抗原刺激がつづいた場合の過剰反応はしばしば自己細胞をも損傷する場合があるため、サプレッサーT細胞が過剰なリンパ球の増殖を抑制することで、自己組織を保護する。

### 血液の細胞をつくる

生体から大量に血液が失われたときには輸血処置が行われるが、輸血用のヒト保存血は、しばしば不足し、また、感染の危険性もある。

そこで、これらの問題を克服するために、人工血液や人工血球などの代替血液の開発が試みられている。人工血液は、血液中の蛋白以外の成分、すなわち電解質溶液ともいえる、最も単純なものとしては生理食塩水があるが、血中滞留性は低い。そこで、血

漿増量剤としては高分子量で適切な速度で体外に排泄されるうえ、生体に対する安全性も高いデキストランが臨床応用されている。

### 1. 人工赤血球

酸素の供給は生命の存続のために必要不可欠である。酸素供給を目的とした人工血液は、化学合成物質であるパーフルオロカーボン(PFC)とヘモグロビン蛋白を含む半人工的なものがある(図4)。

PFCは、水の約20倍の酸素(40 vol.%)を溶解できる液体である。液体中であるにもかかわらず、動物はこの中で1時間もの間、生存し、その後、通常的环境下に戻しても正常に生活することができる。しかし、PFCの問題点は、水と相溶しないために、乳化して体内に投与しなくてはならないこと、また、酸素との結合能力が高すぎるために末梢組織における酸素放出が不十分な点である。

しかしながら、PFCを利用したFluosol DAをはじめ、多くの臨床例が検討されてきた。一方、酸素飽和度に応じて酸素の吸着と解離を効率よく行うヘモグロビン蛋白を赤血球から分離して人工血液に利用する試みも行われてきた。赤血球から単離するこ

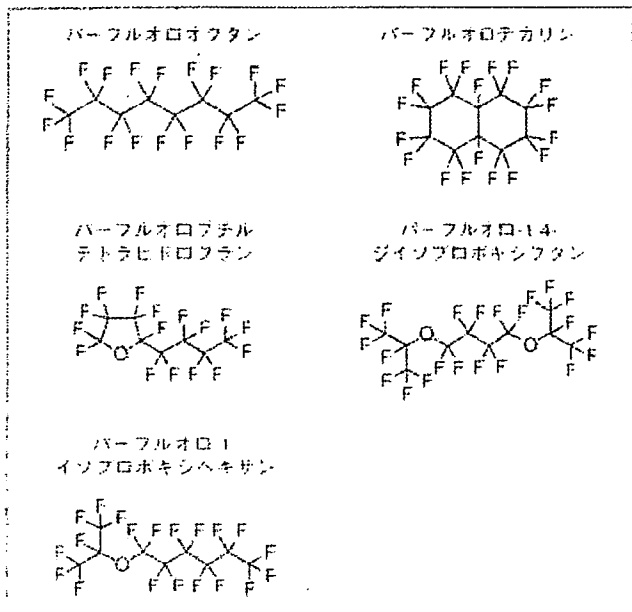


図4 人工血液に利用されるパーフルオロカーボン

とにより、生体での拒絶反応を抑制できるようになったものの、酸素の放出効率が低下したり血中半減期が短縮される欠点もある。そこで、ヘモグロビンを化学修飾したり、ポリエチレングリコールを結合させることで、血中から排出されにくくする工夫が行われた。近年では、高純度のヘモグロビンを高濃度に溶解した溶液をリボソームに内包させた人工赤血球の開発が進行している。国内ではテルモのTRM645があり、この保存期間は2年と長く、近く実用化が期待されている。これまでの動物を利用した研究では、持続的にTRM645を注入した結果、生体から分離した赤血球を注入した場合と同程度に生体機能を維持できたことから、今後、大量の輸血が必要となった場合の保存血不足を解消できるだろう。

## 2. 人工血小板

血小板は24時間程度しか保存できず、凍結血小板やフリーズドライした血小板を利用する試みがある。しかし、感染などは避けられず、血小板代替物や人工血小板の開発が進められてきた。これらは、ヒト血小板からさらに分裂させた小胞体 (particles derived from human platelet)、あるいは血小板表面レセプターやそれらのリガンドである血液凝固因子、フィブリノーゲンなどを有する小胞体の作製で、

フィブリノーゲンや凝固因子をコートした高分子を用いた研究では、血小板減少症を改善できたことも報告されている。

同様の目的で、血液凝固因子を遺伝子操作により作製する試みもある。しかし、生体内で機能する血液凝固因子を作製するためには、翻訳後修飾のカルボキシル化が重要であることから、遺伝子組換えをさせる細胞として、哺乳類細胞を宿主細胞としなくてはならない。また、第Ⅷ因子はおよそ300 kDaもある分子量の大きな蛋白で、これもまた、翻訳後のグリコシル化が必要である。現在までに、第Ⅷ因子、第Ⅸ因子、第Ⅹ因子などは、すでに合成法が完成しており、血友病患者の治療薬として認可されている。

## 血液の細胞を使う

生きた細胞を利用した再生医療のための細胞を採取できる組織として、皮膚、粘膜、骨髄、脂肪組織と並んで、血液も有望である。採取された細胞は、そのまま利用される場合もあるが、培養系で増殖させたり、活性化させたり、遺伝子改変させたり、また、分化誘導させたあとに移植される場合もある。成熟細胞を、生体外で機能を維持したまま増殖させることは通常困難であるが、近年、多くの組織幹細胞が見いだされ、有用な細胞の入手が容易になりつつある。さらに、成人の体細胞をリプログラミングする手法が報告されて話題をよんでいるiPS細胞も、細胞ソースとして期待されている。

### 1. 成分輸血

従来の全血輸血に対して、最近では、成分輸血も一般的になりつつある。成分輸血は、献血された血液を遠心操作により、赤血球、血小板、血漿などの成分に分けて、必要な成分のみを輸血する方法で、輸血量を減少させられるために患者の心臓への負担が軽い利点がある。かつては、輸血液に含まれるリンパ球が患者の体細胞を異物として認識して攻撃する反応(移植片対宿主病: graft versus host disease)による死亡例が多くあったが、輸血液に放射線を照射することによりほぼ安全性が確保されている。

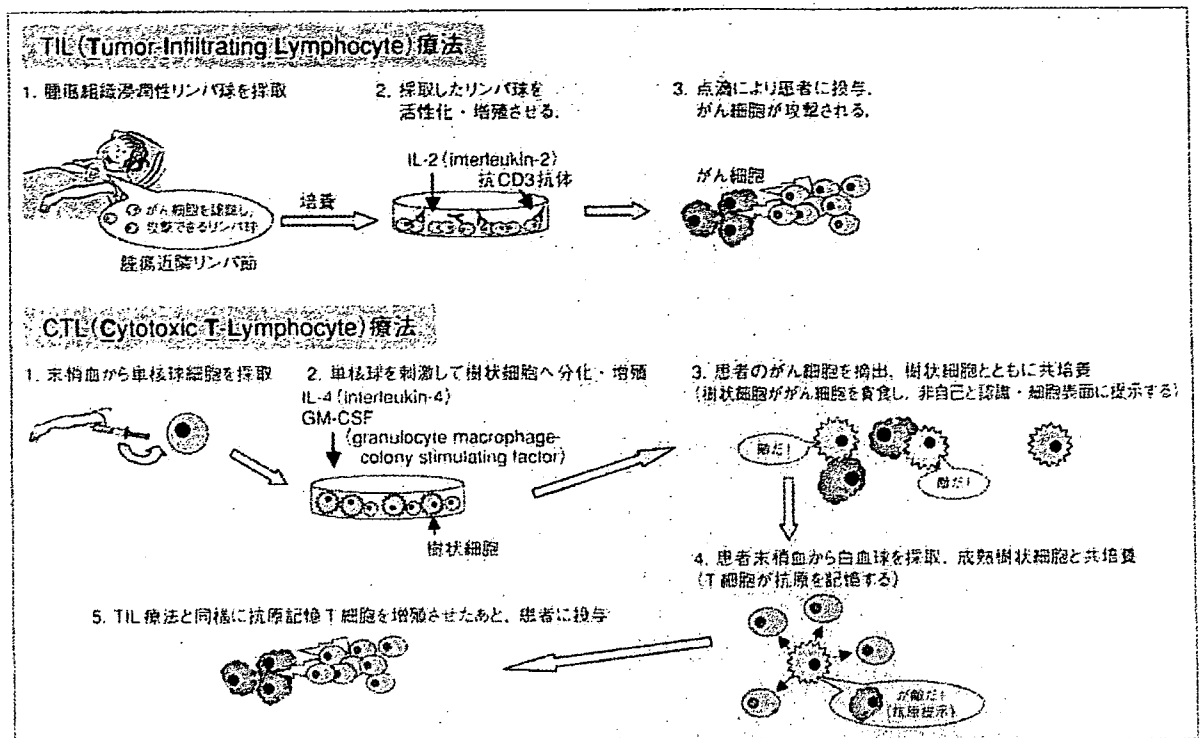


図5 T細胞を利用したがん治療法

## 2. CTL療法とTIL療法

がん治療のためのワクチン療法については、60年以上もの研究が行われているにもかかわらず、治療法として浸透しているわけではない。患者の白血球を利用する治療法のCTL (cytotoxic T-lymphocyte) 療法は、がんの治療に採り入れられている手法である(図5)。これは、患者の血液から分離したリンパ球のうち、キラーT細胞とよばれる細胞分画を、培養系で増幅するとともに、患者のがん細胞を標的とするように教育したのち、患者の血液に移植する方法である。この方法は、特異性の高い攻撃により、殺傷力は強い。

しかし、一つのT細胞は1種類のがん細胞抗原部位しか記憶することができない。さらに、患者の体内で転移したがん細胞は転移先の組織で抗原を変化させる。CTL療法の最大の問題は、がん細胞の組織転移時に起こる抗原の変化に対応できないことにある。このCTL療法の短所を改善する試みも盛んに研究されており、T細胞の利用に加え、ワクチン療法を組み合わせる手法が開発されつつある。

類似の手法として、腫瘍組織浸潤リンパ球

(TIL: tumor-infiltrating lymphocyte) 療法がある(図5)。腫瘍組織から分離したリンパ球を、インターロイキン2などのリンフォカインで増殖させて、活性化させたあとに患者に再移植する手法であり、CTL療法と並んで期待されている細胞移植療法である。

## 3. 細胞移植による再生医療

血球をつくる主な場所は骨髄である。骨髄には造血幹細胞(HSC: hematopoietic stem cell)とよばれる、増殖能が高く、それぞれの血球への分化能を持つ細胞群が存在する<sup>2)</sup>。この細胞群を細胞表面抗原により分離し、培養して増殖させ、サイトカインなどの刺激因子により目的とする血球へ分化させたのち、患者の体内へ戻す試みが行われている。患者自身の造血幹細胞を利用することにより、他人の血液から分離した血球を利用する際の危険性を回避できるとともに、ドナーの不足も解消できる。

一方、体内を循環する血液(末梢血)に血管内皮前駆細胞(EPC: endothelial progenitor cell)が存在することが発見された<sup>3)</sup>。それまで、生体の微小血管形成には、血管を構成する血管内皮細胞が増殖して新た

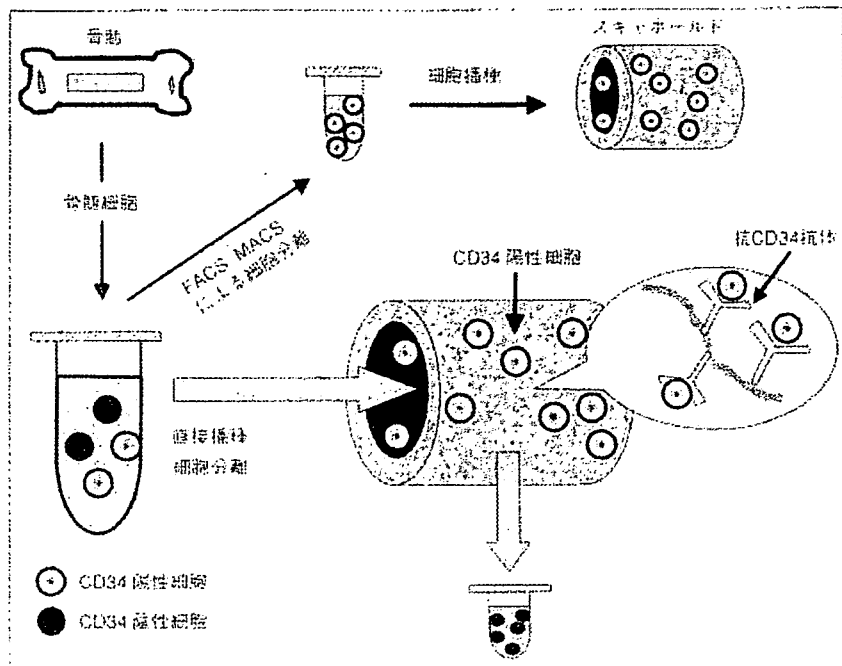


図6  
幹細胞特異的吸着能を有する  
再生型人工血管スキャフォールド

な血管を構築する。血管新生という概念が考えられてきたが、末梢血のEPCが発見されて以来、末梢血にあるEPCが血管を必要とする場所に集結・増殖して新たに血管を形成するという、発生時期のプロセスが成体でも認められるようになった。このEPCは、骨髄と末梢血に存在し、通常は自己平衡状態を保っているが、生体内の虚血部位で産生されるサイトカインや増殖因子などにより、骨髄から末梢血へリクルートされ、虚血部位での血管形成を誘導することがわかっている。

近年、EPCに関連する研究が幅広く行われており、臨床の場での応用とその有用性が注目されている。まず、動物を用いた研究では、閉塞性動脈硬化症やパーキンソン病などの下肢虚血患者に対する治療、あるいは心筋虚血に対する治療として、自家EPC移植が試みられ、良好な結果が報告されている。それに伴い、最近では各国で臨床試験が行われるようになり、患者末梢血中のEPCの動員を向上させるための因子を投与したり、EPCを採取して、患部に局所的にEPCを移植することにより、虚血部の血流回復が報告されている。

これらの血管再生能力を有する細胞群は、今後、再生医療で重要な役割を演じるであろう。1990年代より、骨髄細胞を移植した再生型人工血管の有用性

に関する研究結果が報告され、現在までに東京女子医科大学のグループが、骨髄細胞を利用した再生型人工血管の臨床応用を進めている。

筆者らの研究室では、ポリ乳酸(PLA)製のスキャフォールドを利用した血管再生の研究を進めてきた。しかしながら、側鎖に官能基を持たないPLAなどの表面修飾反応は容易でないため、筆者らは、表面のみをアルカリで加水分解することでカルボキシル基を導入したあとに、幹細胞表面のCD34に対する抗体を固定化した。この骨髄細胞をこの抗CD34固定化スキャフォールドに播種したところ、効率的にCD34陽性細胞をトラップすることが明らかとなった(図6)。この機能性スキャフォールドは、*in vivo*において、末梢血中のCD34陽性の機能細胞をリクルートすることで、速やかな血管組織への再構築を誘導できると期待して検討を重ねている。

## おわりに

生涯にわたって、常に新しく産生を繰り返す血液の特徴を利用した新たな再生医療の展開が期待できる。人工赤血球や人工血小板など血液の代替材料の開発のみでなく、成分輸血など血液成分の利用、がんに対する血液中の免疫細胞の利用、さまざまな

組織の再生を目指した血液の細胞の利用など、新たな領域がつつぎと見いだされている。バイオマテリアル研究の血液との戦いが終結する気配はまったくない。

#### 文 献

- 1) Bowman HW : Clinical evaluation of dextran as a plasma volume expander. *J Am Med Assoc* 1953, 153 : 24-26.
- 2) Sequest 52 : 24, 1979.
- 3) Keipert PE, Chang TM : Pyridoxylated polyhemoglobin as a red cell substitute for resuscitation of lethal hemorrhagic shock in conscious rats. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1985, 13 : 1-15.
- 4) 野上弥志郎, 本多 学, 高橋凡平, 服部秀美, 庄野 聡 - 他 : 致死性出血性ショックに対する人工血液輸血の救命効果と生体に及ぼす影響. *人工臓器* 2006, 35 : S-155.
- 5) Bode AP, Fischer TH : Lyophilized platelets : fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007, 35 : 125-133.
- 6) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H et al. : Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIIb/IIIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 306 : 256-260.
- 7) Kim HW, Greenburg AG : Toward 21<sup>st</sup> century blood component replacement therapeutics : artificial oxygen carriers, platelet substitutes, recombinant clotting factors, and others. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006, 34 : 537-550.
- 8) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K et al. : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2007. Published online Nov 30.
- 9) Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M et al. : AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997, 90 : 5002-5012.
- 10) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R et al. : Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997, 275 : 964-967.
- 11) Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C et al. : Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999, 85 : 221-228.
- 12) Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S et al. : Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001, 103 : 634-637.
- 13) 山岡哲二, 竹部義之, 木村良昭 : 高分子論文集 1998 : 55 : 328-333.
- 14) Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A : Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nat Med* 1996, 2 : 32-34.
- 15) Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Nairo Y, Watanabe M et al. : Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005, 129 : 1330-1338.

PS1-1-5

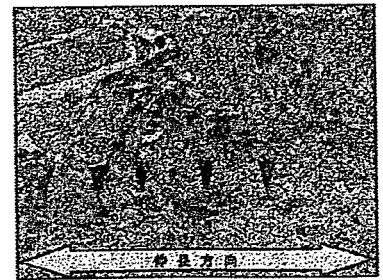
脱細胞化筋スキヤフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導

江橋 具<sup>1)</sup>、永谷憲歳<sup>1)</sup>、橋本成広<sup>2)</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) 大阪工業大学

乳がんなどの手術で欠損した筋組織の補填のために、組織工学的手法を用いた移植用の筋組織作製が検討されている。既存の研究では筋芽細胞を使用していたが、近年、骨髄由来間葉系幹細胞が筋細胞への分化能をもつことが報告されているものの、これを筋組織作成に応用した例はまだない。そこで本研究は、骨髄由来間葉系幹細胞の脱細胞化組織を足場とする三次元培養を行い、細胞を播種したスキヤフォールドを伸長することによる細胞の分化への影響を調べた。

脱細胞化スキヤフォールド内部で培養された細胞は、スキヤフォールドを伸長することにより、細胞が伸長方向に細長く伸びて、一部分では細胞融合して筋細胞様の形態を示した。このことから、これまでに報告のなかった、伸長培養による間葉系幹細胞の筋細胞への分化誘導の可能性が示唆された。



伸長培養により間葉系幹細胞が筋細胞様の形態を示した

## 脱細胞化筋スキヤフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導

江橋 具<sup>1)</sup>、永谷憲歳<sup>1)</sup>、橋本成広<sup>2)</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) 大阪工業大学

### Induction of the Mesenchymal Stem Cell Differentiation into the Skeletal Muscle Cells Using Acellular Tissue

Tomo EHASHI, Noritoshi NAGAYA, Shigehiro HASHIMOTO and Toshia FUJISATO

Department of the Regenerative Medicine & Tissue Engineering,

NATIONAL CARDIOVASCULAR CENTER RESEARCH INSTITUTE

#### 1. 緒言

乳がんなどの腫瘍摘出術や事故などによる外傷性の組織欠損部位に、患者自身の筋皮弁を移植する治療が行われている。しかし、この方法では移植片を摘出した部位が線維化することや、正常組織を切除することによる患者のQOLの低下の問題が残る。そこで、筋組織再生のための研究が行われている。

再生医療的手法を用いた骨格筋再生の研究では、筋芽細胞をゲルに懸濁して筋損傷部位へ注入したり<sup>1)</sup>、近年では脱細胞化した組織に細胞を播種して移植したりする方法が検討されている<sup>2)</sup>。一方、最近では骨髄由来間葉系幹細胞が骨格筋細胞への分化能を持つことも確認されたものの、これを用いて生体外にて筋組織を構築しようとした例はこれまでに報告されていない。

そこで本研究は、脱細胞化筋組織をスキヤフォールドとして用いて、ラット骨髄由来間葉系幹細胞の三次元培養を行い、スキヤフォールドごと伸長したときの細胞の分化への影響について検討した。

#### 2. 実験方法

ミニブタ大腿の筋肉を厚さ 1.6 mm にスライスして PBS に浸漬し、超高静水圧印加処理 (980 MPa, 10 min.) を行った。その後の洗浄工程を経て、脱細胞筋スキヤフォールドを作製した。

ラット大腿骨から骨髄細胞を取得し、培養皿にて培養したものを剥離し、遠心操作によりスキヤフォールドに播種した。細胞を播種したスキヤフォールドを培養皿に移して培養し、3 日後から伸長刺激を与えた。伸長刺激は、細胞培養しているスキヤフォールドの長さを静置していたときの長さの 110% となるように伸ばして固定し、そのまま培地を添加して培養を行った。

伸長刺激による培養細胞への筋細胞分化への影響について調べるため、細胞形態の観察や、

PCR による筋分化マーカー発現量の計測を行った。

#### 3. 結果と考察

骨髄由来間葉系幹細胞を脱細胞化筋スキヤフォールドに播種して、3 日間静置培養を行ったところ、細胞は良好に増殖した。培養開始から 3 日後にスキヤフォールドの両端をクリップで挟み、スキヤフォールドを伸長することによる伸長刺激を与えながら培養を続け、3 日間の培養後の HE 染色写真の観察結果から、細胞が伸長方向と同方向に細長く伸長しており、一部では細胞融合して筋細胞様の形態を示していることが確認された (図)。したがって、間葉系幹細胞が伸長刺激により筋細胞へ分化する可能性が示唆され、これまでに報告されていない新規の分化誘導法になり得ると考えられた。

#### 参考文献

- 1) Breier JP et al., *Plast Reconstr Surg* 118; 1113-1121, 2006
- 2) De Coppi P et al., *Tissue Eng* 12; 1929-1936, 2006



伸長培養により間葉系幹細胞が筋細胞様の形態を示した



## Effect of the stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells

Tomo EHASHI<sup>1)</sup>, Noritoshi NAGAYA<sup>1)</sup>, Shigehiro HASHIMOTO<sup>2)</sup>, Toshia FUJISATO<sup>1)</sup>

1) NATIONAL CARDIOVASCULAR CENTER RESEARCH INSTITUTE, Osaka, JAPAN

2) OSAKA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, Osaka, Japan

### Introduction

Replacing lost soft tissue due to trauma, diseases, or congenital anomalies is still challenging issue in plastic and reconstructive surgeries. In vitro tissue engineering of functional skeletal muscle would be an important subject because to provide physiological functions and physical shape by transplantation of tissue-engineered muscle would increase quality of patients' life. Recently, it is reported that mesenchymal stem cells have ability to differentiate into skeletal muscle cells in conventional monolayer culture by addition of 5-azacytidine to their medium.<sup>1)</sup> On the other hand, it is well known that dynamic stretch culture induces differentiation of the satellite cells and myoblasts into the skeletal muscle cells.<sup>2)</sup>

In this study, mesenchymal stem cells were cultured in an acellular tissue scaffold, and the effects of the stretching of the scaffold on cultured cell differentiation were investigated.

### Materials and Methods

The acellular miniature pig skeletal muscles as the scaffolds for cell culture were prepared by cold isostatic ultra-high pressuring of 980 MPa for 10 min followed by washing process. Mesenchymal stem cells were isolated from femoral bone of SD rats weighing 200 g and cultured on collagen-coated dish.

Two or three times subcultured cells were harvested from dishes and inoculated in the scaffolds by centrifugal force (100 g x 1 min. x 6 times), and the scaffolds with cells were placed in chambers (Fig. 1A). After 4 h, medium was added in each chamber, and cells were cultured for 3 days.

After 3 days of culture, scaffolds were transferred into the silicone chamber and were clipped at both edges of oblong scaffold. The scaffolds were then statically stretched up to 110% length of the scaffold and kept that length (Fig. 1B). As a control, cells were cultured in the original length of the scaffold.

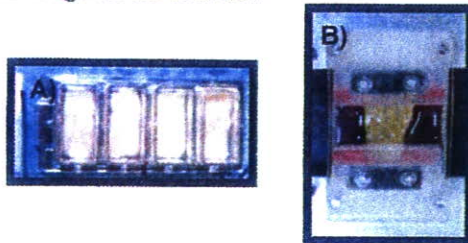


Fig. 1. Cells cultured in the scaffold. A) After cell inoculation into the scaffold, cells were cultured in the chamber for 3 days. B) On the 3<sup>rd</sup> day of pre-culture, scaffold were clipped at both edges and stretched

The effect of the elongating stimulation on the cells was evaluated by the cell shape in the scaffold and skeletal muscle specific marker expression rate by RT-PCR.

### Results and Discussion

No nucleus was observed in the acellular skeletal muscle and the scaffold maintained original elastic modulus. In some area, small vessel paths were remained in the scaffold. This means the scaffold may have a possibility to be vascularized and easily reconstructed to skeletal muscle after transplantation.

During first 3 days of culture, cells were well grown in the scaffold. All scaffolds were shrunk following cell proliferation. Histological observation showed that cells were existed not only the edge of scaffold but in the collagenous region of the inner part of the scaffold. After 3 days of static stretch stimulation, cells were elongated along the stretched direction (Fig. 2A). In some area, cells were likely to be fused as known in the myoblasts differentiation into skeletal muscle cells. On the other hand, all cells in the control group showed round shape (Fig. 2B).

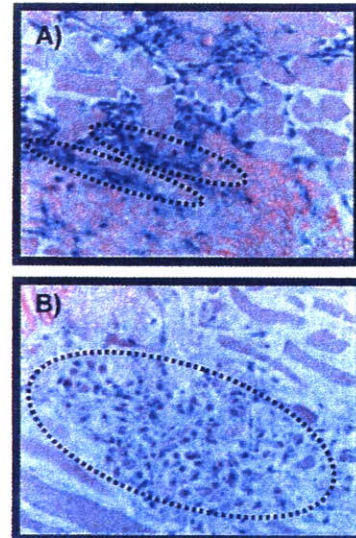


Fig. 2. Histological evaluation of the cells after stimulation. A) Statically stretched cells were elongated in the scaffold (circled area). B) Cells that were not stretched showed still round shape (circled area).

### Conclusions

In conclusion, statically stretch stimulation in the mesenchymal stem cells cultured in the acellular scaffold may have possibility to effect on induction of cell differentiation into the skeletal muscle cells.

### References

1. Wakitani S et al. Muscle & Nerve 18: 1417-26; 1995
2. Vandenburg HH. Am J Physiol 262: R350-5; 1992

### Acknowledgements

This study was supported by a grant from the Ministry of health, labour and welfare of Japan.



For purpose to repair soft tissues, many research groups have been using porous scaffolds incorporated with cells *in vitro* or *in vivo*. General way for seeding cells in porous scaffold is dropping cell suspension on it, and then the cells may impenetrate into the scaffold spontaneously. However, it is not easy to seed cells completely inside of the scaffold having small pores. In this study, non-needle injector was applied to cell seeding into the tissue-derived acellular scaffolds.

The acellular cardiac muscle scaffolds were prepared by cold isostatic ultra-high pressure treatment (980 MPa for 10 min. at 4 degree Celsius) following washing steps. Cultured L929 cells were harvested from the culture dish and suspended in the PBS(-) at the density of  $1.0 \times 10^6$  cells/mL. They were then injected into the acellular scaffold with the non-needle injector for percutaneous insulin administration (SHIMAJet<sup>®</sup>; Shimadzu Corporation, Japan) or the conventional syringe.

From the histological study, all nuclei were washed out from the scaffold and small pores in the range of 20–50  $\mu\text{m}$  were observed among the cell skeletons. Most of the cells seeded into the scaffold with the injector were stained by calcein-AM as viable cells 24 hrs after the injection. They were scattered over a wide area in the scaffold, whereas the cells were located in cellular aggregation when injected by the conventional syringe. In conclusion, the non-needle injector may be suitable for the cell seeding into the small pore scaffolds.

**(303) Novel Cell Seeding Method for the Tissue-derived Acellular Scaffolds**

Ehashi T., Somekawa S., Udagawa H., Fujisato T.

National Cardiovascular Center Research Institute, Dept Regenerative Medicine & Tissue Engineering, Osaka, Japan

P2-048 Novel method for interspersed cell inoculation into the tissue-derived scaffold

<sup>1)</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, <sup>2)</sup>Shimadzu Corporation, <sup>3)</sup>Osaka Institute of Technology

Ehashi T<sup>1)</sup>, Somekawa S<sup>1)</sup>, Udagawa H<sup>2)</sup>, Fujisato T<sup>1),3)</sup>

**Background** Many research groups have used the porous scaffold for purpose to repair tissues in regenerative medicine and tissue engineering therapy. In a general way to populate scaffolds in vitro, suspended cells are dropped on it and cells enter by the pores. However, this method is not appropriate for the tissue-derived scaffolds with small pores. To overcome this difficulty, non-needle injector was used to inoculate cells into the tissue-derived scaffolds.

**Methods** The ultra-high pressure treated cardiac muscles were prepared as the acellular scaffolds. Cultured L929 cells were harvested from the culture dish and suspended in PBS (-) or collagen gel at the density of  $1.0 \times 10^6$  cells/mL. To inoculate cells into the scaffold, the non-needle injector (SHIMAJet<sup>®</sup>, Shimadzu Corporation, Japan) which is commercially used as the percutaneous insulin administration was applied. The conventional syringe was used in the comparative study. After the cell inoculation, cell distribution and cell viability in the scaffold were investigated from the histological observation.

**Results** The prepared scaffolds were more porous than non-treated cardiac muscle but it was difficult to inoculate cells in a general way. Cells inoculated with the non-needle injector were scattered over a wide area in the scaffold and most of the cells survived after 24 hours culture. On the other hand, PBS (-)-suspended cells were leaked from the scaffold and collagen gel-suspended cells localized with cellular aggregation in the scaffold when a conventional syringe was used.

**Conclusion** The novel cell inoculation method for tissue-derived scaffold was developed by using non-needle injector.

## Acellular skeletal muscle scaffold as an inducer of muscular differentiation

T. Ehashi<sup>1</sup>, S. Hashimoto<sup>2</sup>, T. Fujisato<sup>2</sup>

<sup>1</sup>; Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka, JAPAN, 565-8565;

<sup>2</sup>; Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1, Omiya, Osaka, Osaka, Japan 535-8585

### Introduction

Soft tissue-replacement therapies for trauma, tumor, and congenital anomalies are still challenging area in plastic and reconstructive surgeries. In some cases, autologous normal skeletal muscle tissue is transplanted as a surgical flap and this treatment may cause decreasing of patient's quality of life.

Recently, tissue-engineered skeletal muscles using scaffold for treatment of tissue defects have been investigated. In these studies, some kinds of scaffolds including synthetic materials and acellular tissues have been applied as the substrates. Among these scaffolds, acellular skeletal muscles may be a hopeful substratum for skeletal muscle reconstruction both *in vivo* and *in vitro* because the remaining extracellular matrices and paths of nerves in the scaffolds help cellular invasion and reconstruction of tissues. For example, after the acellular tissue transplantation to the tissue defects in animal experiments, proliferated satellite cells may migrate in the scaffold, differentiate into the myoblasts, and form new skeletal muscle. Besides, it is reported that myoblasts have developed into contractile skeletal muscle tissues *in vitro* using acellular tissues.

On the other hands, many researchers reported that stretch-cultured myoblasts on the silicone surface have formed myotubes. Satellite cells or myoblasts therefore are considered to differentiate and be matured by stretch stimulations.

In this study, we cultured myoblasts or mesenchymal stem cells in the acellular skeletal muscle tissue prepared by ultra-high pressure treatment. As a stimulation factor for differentiation or maturation of the cells into the skeletal muscle cells, stretch stimulation was applied. The effects of our acellular scaffold as a substrate in the stretch culture on the cell differentiation and morphology were investigated.

### Materials and Methods

Porcine femoral skeletal muscles were sliced into the 3-mm thickness and packed with PBS. These tissues were applied ultra-high pressure at 980 MPa for 10 min to destroy cells, and washed with PBS-based buffer for 3 weeks to remove cell debris in the tissue.

Rat mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from femoral bone and cultured on the collagen-coated dishes over one month to expand cells.

The MSCs or myoblast cells were seeded into the acellular skeletal muscle scaffold at the density of  $1 \times 10^6$  cells/scaffold and were cultured statically for 3 days. On the third day, scaffolds with cells were clumped at the both edges, and elongated to 110% of initial length, and kept that length for 3 days (elongation group). In the stretch culture, scaffolds were stretch intermittently for 3 days (stretch group). Non-stretched cultures were made as control groups. The RNAs were extracted from cultured cells and expression of skeletal muscle

differentiation markers were investigated using real time-PCR. The cellular morphologies were compared between stimulated and control groups.

### Results and Discussion

From the histological observation, no nuclei were observed and DNA amount in the scaffold were dramatically decreased. Extracellular matrices and skeletal muscle cellular skeletons were remained in the scaffolds. These components in the scaffold are thought to maintain elastic modulus of the scaffold after decellularization treatment.

Cultured rat MSCs and myoblasts showed their differentiation ability into the skeletal muscle cells by stimulating factors. MSCs formed myotube 3 weeks after 5-azacytidine stimulation that is generally used. On the other hands, myoblasts changed cell morphology and formed myotube after confluent in the dish culture.

After 3 days of static culture of both cells, all scaffolds were shrinked by the cellular contractile forces. Cells were existed not only the surface but inside of the scaffold. All cells in the scaffolds showed round shape at that time. In the myoblast stretch culture group, cells kept round shape after 3 days of culture. However, in the static culture as a control group, some cells demonstrated giant cytoplasm with the cell nuclei existed near cell membrane similar to the skeletal muscle fiber *in vivo* (Figure). There was no particular change by the stretch stimulation on the myoblasts in the acellular scaffolds. In the elongation culture, MSCs in the scaffolds extended along with elongated direction of the scaffolds. In some areas, cells were fused and showed myotube-like morphology in spite of keeping round shape in the control group.

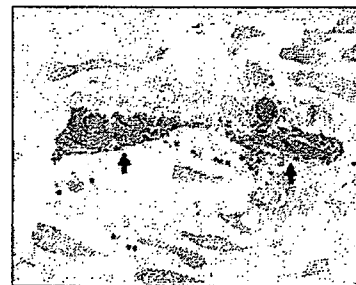


Figure. In the acellular skeletal muscle scaffold, myoblast cells demonstrated skeletal fiber-like morphologies after 6 days of static culture (arrows).

### Conclusions

Our acellular skeletal muscle scaffold is thought to affect on myoblast differentiation and maturation. And more, elongating stimulation has possibility to act on the MSCs as an inducer of differentiation into the skeletal muscle cells.

O-35-1 下肢虚血細胞移植療法におけるEBM確立をめざしたMRI細胞トラッキング技術

橋 洋一<sup>1</sup>, 寺本 昇<sup>2</sup>, AGUDELO CARLOS<sup>1</sup>, 園見純一郎<sup>2</sup>, 飯田 秀博<sup>2</sup>, 山岡 哲二<sup>1</sup>

<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生体工学部, <sup>2</sup>国立循環器病センター研究所先進医工学センター放射線医学部

近年、再生医学の進歩により細胞移植治療が数多く検討され、良好な回復結果が報告されている。それに伴い、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が高まっている。我々は、非侵襲で、且つ非破壊的に生体内を観察できるMagnetic Resonance Imaging (MRI)に着目し、下肢虚血モデルラットを用いて移植細胞の追跡を行った。移植細胞としては、骨髄由来間葉系幹細胞を用いた。移植細胞を追跡するために、ガドリニウムを中心金属とした長期細胞ラベル化用MRI造影剤を開発し、エレクトロポレーション法を用いて移植細胞に導入した。この手法により、造影剤は細胞内に効率良く導入され、細胞内に12日間安定に存在するところがあった。また、造影剤を内包させることによる、分化への影響について検討した。さらに、ラットの大腿動静脈を結紮し、下肢虚血モデルラットを作成した。虚血作成後、1X10<sup>6</sup>個の細胞の移植を行いレーザードップラー法により血流の回復過程を観察した。同時に、動物用MRIを用いて経時的に移植細胞の追跡を行い、in vivoにおける細胞の状態と回復過程の相関関係について検討した。以上より、非侵襲に移植細胞の影響を評価できることが示唆された。また、本手法は細胞種に依存せずMRI用造影剤の導入が可能であることから、下肢虚血のみでなく、様々な再生移植治療における応用が期待できる。本研究は、厚生労働科学研究費補助金「医療機器開発推進研究事業」によるものである。

O-36-2 毛細血管の再構築を誘導できる新規スキャフォールドの開発

江橋 具<sup>1</sup>, 馬原 淳<sup>2</sup>, 寺田 堂彦<sup>2</sup>, 藤里 俊哉<sup>3</sup>, 山岡 哲二<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>国立循環器病センター研究所生体工学部, <sup>3</sup>大阪工業大学大学院生体医工学科

【目的】事故や腫瘍摘出などにより、広範囲にわたって失われた組織を補填する治療として、患者の健全な組織を血管網とともに移植する、筋皮弁術が行われる。しかし、この方法では患者のQOLの低下が著しいことから、合成材料や細胞を用いる再生医療型の治療法が検討されている。巨大な組織を再生するには、組織内部の細胞に栄養を供給するための毛細血管網の構築が不可欠である。しかし、未だ決定的な手法は確立されていないため、生体内あるいは生体外で、いかに毛細血管網を構築するかが注目されている。一方、最近、細胞周囲の微小環境が、未分化細胞の分化・成熟や機能の発現に影響を及ぼすことが報告されてきた。そこで本研究は、脂肪組織を加工することにより、血管構築を誘導できる微小環境を有する新規スキャフォールド作製を目的とした。【方法】ラット皮下脂肪を酵素あるいは有機溶媒を用いて脱脂したのち、組織学的に観察するとともに、空隙率や空孔の大きさを計測、さらに引張や圧力試験により力学特性を調べてスキャフォールドとして適用できるかを検討した。【結果と考察】組織学的検討の結果、脱脂脂肪組織内には、血管網を構築していた基底膜などのマトリクス構造が三次元的に良好に残存していることが確認され、この微小環境構造により、本研究で作製したスキャフォールドが毛細血管網を誘導できる可能性が示唆された。

## 超高静水压印加処理による脱細胞神経グラフトの作製

○西垣戸麻美<sup>1)</sup>、江橋 具<sup>2)</sup>、山岡哲二<sup>1)</sup>、藤里俊哉<sup>2)3)</sup>

- 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) 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
- 3) 大阪工業大学 大学院工学研究科 生体医工学科

### 1. 緒言

頭面や四肢の神経麻痺を引き起こす神経障害やがん切除による神経損傷において、創部が大きい時には、神経切断部の両端を縫合することは難しい。このような場合の治療法は、患者自身の腓腹神経などを摘出して移植する自家移植が主流であるが、正常な神経を新たに傷害することが問題となっている。そこで、生体吸収性の神経誘導管や、生体由来神経を酵素や化学薬品で処理して作製した脱細胞化神経を用いた治療法が検討されている。

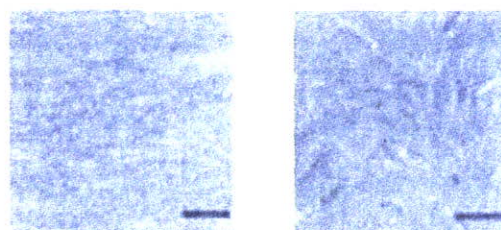
われわれは、脱細胞化神経に残った神経構成タンパク質の組成や構造が、神経の再生を促進すると考え、本研究グループで開発された超高静水压印加処理による脱細胞化処理法を用いて、脱細胞神経グラフトを作製した。

### 2. 実験方法

ラットから坐骨神経を採取し、PBS とともに袋に封入して、超高静水压印加装置を用いて 980 MPa の圧力を 10°C で 10 分間加えた。この操作により組織の細胞を破壊したのち、細胞残渣を除くため、所定の洗浄液にて洗浄した。この洗浄のみでは、細胞成分のリン脂質を完全には取り除けないので、次に、3 日間イタノール処理を行い、その後 PBS に置換した。ラットの正常坐骨神経と脱細胞処理後の坐骨神経の H&E 染色と免疫染色を比較し、処理後の神経が神経再生のための足場材料として適しているかを検討した。

### 3. 結果と考察

H&E 染色切片観察の結果、超高静水压脱細胞処理により、坐骨神経組織から細胞成分がほぼ完全に除去されていることが確認された(図1)。また処理後の神経には、構造タンパク等の神経構成成分が残っていた。これらのことから、本研究で作製した脱細胞組織は、神経を再構築するための足場として適しており、脱細胞神経グラフトとして利用できる可能性が考えられた。この脱細胞神経グラフトを、ラット坐骨神経切断部位に移植した後の神経組織と機能の回復についても報告する。



(1) acellular nerve (2) fresh nerve

Fig1. H&E staining of (1) acellular and (2) fresh nerve tissue. Bars, 50 micrometers.

### Acellular nerve graft prepared by ultra high pressure treatment

Manii NISHIGAITO, Tomo EHASHI, Tetsuji YAMAOKA, Toshiya FUJISATO

Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center  
National Cardiovascular Center Research Institute  
5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

TEL +81-6-6833-5012 (ext 2622) FAX +81-6-6835-5476 E-mail yamtet@nccvc.go.jp

O-12-6 X線照射したラット浅下腹壁動脈における創傷治癒の障害を緩和させる方法の開発

杉山 賢司, 高梨 昌幸, 石川山起雄, 江角 浩安

国立がんセンター東病院臨床開発センター実験動物管理室, 国立がんセンター東病院形成外科, 東邦大学医学部病理学講座, 国立がんセンター東病院

【目的】放射線障害での標的の一つは血管であると言われている。がん患者への放射線療法後の組織再手術では、照射された血管の癒合が必要な場合があり、癒合部の治癒が組織再建の成否に影響すると考えられる。本研究の目的は、X線照射した動脈の創傷治癒の障害を緩和する方法を開発する事である。【方法】ラット左大腿部にX線(7.5Gy)を4週間5回照射した。1ヶ月後、左浅下腹壁動脈を切断、縫合した。あるいは、同動脈をクランプで10分間挟み、クランプ損傷を作成した。対照には、右浅下腹壁動脈を創傷した。1~2週間後、病理組織学的解析を行った。【結果】血管吻合実験では、非照射動脈の吻合部に、内皮細胞による新生内皮と平滑筋細胞層が形成されたが、X線照射した浅下腹壁動脈では、術後2週間でも、内皮細胞の剥離、内腔および中腔への炎症細胞浸潤、中腔平滑筋細胞の壊死が認められた。クランプ損傷実験でも、同様な異常が起っていた。また、基底膜にはlamininおよびcollagen IVの蓄積が認められた。この蓄積はTNF $\alpha$ シグナルの亢進に起因すると推察されたので、可溶性TNF $\alpha$ 受容体(Etanercept, 0.3mg/kg体重)をクランプ損傷前後、4回皮下投与した。その結果、内腔および中腔の修復が認められ、クランプ損傷は治癒していた。【結論】X線照射した動脈では、創傷後の内腔・中腔の修復が困難であったが、Etanerceptは血管の治癒を促進させる可能性を持つ事が示唆された。

O-12-7 生体内に類似した拍動性機械刺激のヒト間葉系幹細胞に対する血管平滑筋と骨への分化の影響の検討

村瀬 洋介, 成田 祐司, 各務 秀明, 山脇 龍歌, 清水 一憲, 本多 祐之, 井藤 彰, 室原 豊明, 上田 実

名古屋大学大学院医学系研究科循環器内科, 名古屋大学医学部臨床細胞治療学・組織工学, 東京大学医科学研究所, 名古屋大学工学研究科化学・生物工学専攻, 九州大学工学研究科化学工学部門, 名古屋大学大学院医学系研究科顎顔面外科

【背景】間葉系幹細胞(MSC)は、血管平滑筋細胞(SMC)をはじめ様々な間葉系の組織に分化する能力を備えた多能性前駆細胞であり、血管のtissue-engineeringに有用である。しかしながらMSCをSMCに分化させる効率的な方法については一定したものはなく、またMSCの骨分化能のための石灰化の危険性という問題が議論される。【目的】この研究の目的は、生体内に類似したpulsatile mechanical stress(PMS)がMSCのSMCおよび骨の分化に与える影響を調べる事である。【方法】磁性ナノ微粒子を磁力を用いることによって、脱細胞化したブク頸動脈の外壁に数層のヒトMSCを播種、培養した。bioreactorを用いて生細胞を拍動流を生み出し、培養液を頸動脈内腔を通して循環させることによって生体内の動脈壁により近い環境を作り出した。SMCと骨細胞のそれぞれ特異的遺伝子の発現を、12, 24, 48時間後にPMS(100/50 mmHg, Hz)と静置培養において定量的リアルタイムPCRによって評価した。【結果】SMC特異的遺伝子には12時間以後に静置培養よりもPMS下において有意に発現が増加した( $P < 0.05$ , two-way ANOVA)。骨細胞の特異的遺伝子にはPMS下、静置培養のどちらにおいても発現の低下はみられなかった。【結論】PMSはSMCの特異的遺伝子の発現をin vitroの生体内に類似した条件下で増加させた。骨細胞の特異的遺伝子の発現はPMSでは減少せず、石灰化の起こる可能性は有義なものと考えられた。

O-13-1 タミバロテン(Am80)の外傷性脊髄損傷におよぼす作用

武永美津子, 太田 有紀, 都倉 孝恵, 濱口 明美, 五十嵐理恵

聖マリアンナ医科大学神経治療研究センター

Am80は、核内レセプターのRAR $\alpha/\beta$ のみを活性化し、RAR $\gamma$ をRXRsには結合しない合成レチノイドである。本研究ではAm80の落鍾法にて作製したラット外傷性脊髄損傷におよぼす作用を運動機能で評価し、機能評価後の脊髓を用いて検討した。その結果、Am80投与群では経口投与(3mg/kg)および局所投与(0.15mg/kg)いずれも、SCIコントロール群に比べBasso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアで評価した運動機能の改善を有意に認めた。損傷3週間後トレッドミルテスト(8m/min)を5分間施行したところ、障害を受けた後肢の歩行時間は、SCIコントロール群で平均2分39秒、経口投与群で2分57秒、局所投与群で3分32秒であった。また歩行を中止し後肢間に接触する回数は、SCIコントロール群は平均48.3回であったのに対し、経口投与群で16.0回、局所投与群で13.1回と有意差がみられた。損傷28日目の損傷部周囲の空洞面積は、SCIコントロール群の面積に比べ著明に減少した。MHPなどの神経特異マーカー、神経栄養因子受容体などについて、組織免疫染色およびWestern blot 解析を行ったところ、Am80投与群で発現量の増加がみられた。以上の結果から、Am80は神経栄養因子受容体を増加させて神経栄養因子の神経細胞保護作用、分化誘導促進作用に寄与したことが示唆された。

O-13-2 超高压印加処理により作製した脱細胞化神経の移植

西垣戸麻実, 江橋 具, 廣里 俊哉, 森反 俊幸, 山岡 哲二

国立循環器病センター研究所先進医学センター生体工学部, 国立循環器病センター研究所先進医学センター再生医療部, 大阪工業大学大学院工学研究科生体工学科, 鈴鹿医療科学大学医工学部臨床工学科

【目的】末梢神経障害に対する自家移植では、正常な神経を傷害する問題がある。そこで、異種神経組織の細胞外マトリクス構造を用いた組織再生を進めている。異種間移植での拒絶反応を抑えるために、産卵が開始した超高压印加処理により脱細胞化神経グラフトを作製し、ラット異種移植モデル系により評価した。【方法】ラット坐骨神経を採取し、超高压印加処理で細胞を破壊した後、細胞残渣を取り除くために、所定の洗浄液で洗浄した。さらに、細胞成分のリソ脂質をより完全に除去するために、3日間エタノールで処理し、PBSに置換した。作製した脱細胞化神経グラフトを異なる系統のラットに移植する異種移植モデル実験を行った。移植後の形態学的観察と組織観察、さらに神経機能の回復を調べるための活動電位の計測を行った。【結果と考察】脱細胞化処理により、細胞成分がほぼ完全に除去されたことをシェンク細胞とグリア細胞に対するGFAP免疫染色が陰性であることにより確認した。一方、HE染色の結果、神経組織構成タンパクの構造は、よく維持されていることが示された。3ヶ月移植後には、GFAP陽性細胞が認められたことから、細胞成分が脱細胞化神経グラフト内部に侵入し、神経を再生しつつあると考えられた。発表では、移植後の神経の機能評価結果にも報告する。1) 産卵後産卵、超高压印加処理による移植用生体組織の処理法、特開2004-97552

KB 投与  
脊髄の回復  
回復

Handwritten notes and diagrams, including "SH-5454" and "Lipid" with arrows pointing to the text.



## 生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発

医療機器センター ○寺田堂彦、大阪成蹊短大 澤田和也

国立循環器病センター 緒方裕之・江橋 具・平工香織・鎌田和加子・永谷憲歳・藤里俊哉・中谷武嗣  
先端医療振興財団 吉田謙一、東京医科歯科大 船本誠一、岸田晶夫

## &lt;緒言&gt;

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。大動脈組織のように、主に細胞外マトリックスから成る組織を再生させるためには、自己組織がある程度再生されるまでの間、力学的負荷に耐え得る細胞の足場（スキヤフォールド）が必要となる。我々は、生体適合性、解剖学的類似性など種々の利点から、生体組織由来のバイオスキヤフォールドの開発を行っている。本研究では、生体組織から細胞成分や移植後の石灰化の要因として挙げられているエラスチンを取り除き、コラーゲンのみを残存させたバイオ血管スキヤフォールドを作製し、大動物実験においてその有効性の検討を行った。

## &lt;実験&gt;

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、エタスターゼ（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。さらにアルコール処理によって細胞膜成分であるリン脂質の抽出除去を行った。作製したバイオスキヤフォールドを同種同所性に移植し、組織染色および免疫染色により自己組織化の評価を行った。

## &lt;結果・考察&gt;

図1には、作製したスキヤフォールドのHEおよびEVG染色写真を示した。ドナー由来の細胞およびエラスチン線維はすべて除去されていた。

図2には、移植3ヶ月後に取り出したスキヤフォールドのHE染色写真を示した。スキヤフォールド内に新たにレシピエント由来の細胞が無数に浸潤していた。抗CD3抗体、抗 $\alpha$ -SMA抗体、および抗ビメンチン抗体免疫染色の結果から、これらの細胞は免疫反応により集結したT細胞ではなく、主に平滑筋細胞および線維芽細胞であることを確認した。さらに、コッサ染色の結果から、移植後3ヶ月の時点においてスキヤフォールド内に石灰化はまったく認めなかった。

スキヤフォールド内部の大部分はレシピエント細胞によって再細胞化されており、石灰化も全く認めなかったことから、再生型バイオ人工血管としての有効性が示唆された。

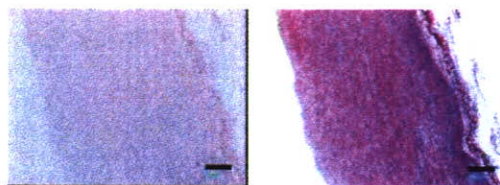


Fig.1 The cross-section of treated vascular grafts. Left, H.E. staining; Right, EVG staining. The bars in the pictures are corresponding to 200  $\mu$ m.

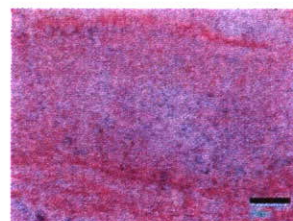


Fig.2 The cross-section of the explanted graft after 3 months of the implantation. The bar in the figure is corresponding to 200  $\mu$ m.

**Development of acellular vascular graft having in vivo repopulation ability.**

Dohiko TERADA<sup>1</sup>, Kazuya SAWADA<sup>2</sup>, Hiroyuki OGAKA<sup>3</sup>, Tomo EHASHI<sup>3</sup>, Kaori HIRAKU<sup>3</sup>, Wakako KAMATA<sup>3</sup>, Ken'ichi YOSHIDA<sup>4</sup>, Seiichi FUNAMOTO<sup>5</sup>, Noritoshi NAGAYA<sup>3</sup>, Akio KISHIDA<sup>5</sup>, Toshia FUJISATO<sup>3</sup>, Takeshi NAKATANI<sup>3</sup> (<sup>1</sup>JAAME, 3-42-6 Bunkyo-ku, Hongo, Tokyo, 113-0033 Japan <sup>2</sup>Osaka Seikei College, 3-10-62 Aikawa, Higashiyodogawa-ku, Osaka, 533-0007 Japan <sup>3</sup>NCVC, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka, 565-8565 Japan <sup>4</sup>FBRI, 2-2 Minatojima-minami, Chuo-ku Hyogo 650-0047 Japan <sup>5</sup>Tokyo Dent. Med. Univ. Tokyo, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062 Japan)  
<sup>1</sup>Tel: +81-6-6833-5004 (Ext. 2362), Fax: +81-6-6835-5496, E-mail: terada@ri.ncvc.go.jp

**Key Word:** tissue engineering / acellular vascular graft / decellularization / elastin / calcification / repopulation

**Abstract:** An acellular vascular graft for regenerative medicine was developed from a porcine aortic tissue. After dehydration heat cross-linking treatment, an aortic tissue was digested in an enzymatic solution to remove elastin completely. The elastic fibers were digested enzymatically even after the cross-link and it was confirmed histologically that the tissue has no elastic fiber and cellular components inside. The vascular grafts made of miniature pig descending aorta were transplanted allogeneically. There was no thrombus on the intimal surface and aneurysm formation even after 3 months of the implantation. A large amount of the cell migration into the graft was observed. These cells were identified immunohistologically as smooth muscle cells and fibroblasts. And no calcific deposition was seen in the explanted graft after 3 months of the implantation. We conclude that the collagenic vascular graft developed in this study may be adapted to the vascular tissue regeneration.

identified immunohistologically as smooth muscle cells and fibroblasts. And no calcific deposition was seen in the explanted graft after 3 months of the implantation. Currently long-term implantation experiments, 6 and 12 M, are in progress.

The processed graft may have better ability to promote cell infiltration and tissue remodeling compared with the acellular tissue without elastin digestion. We conclude that the collagenic vascular graft developed in this study may be adapted to the vascular tissue regeneration.

**(115) Development of the Regenerative Vascular Graft Having an *In Vivo* Repopulationality**

Terada D., Sawada K., Ogata H., Ehashi T., Hiraku K., Kamata W., Yoshida K., Funamoto S., Nagaya N., Kishida A., Fujisato T., Nakatani T.

Osaka institute of Technology, Dept Biomed Eng, Osaka, Japan

Although an artificial blood vessel is in general use, the development of regenerative vascular grafts is strongly desired especially for the pediatric patients. In this study, regenerative collagenic vascular grafts were developed from porcine aorta by removing cells and structural proteins except collagen from the tissue.

Porcine aorta was isolated from the Clawn miniature pig (Japan Farm, Co. Ltd.). The tissue was placed in a vacuum oven at 120°C to cross-link collagen fibers. Elastin fibers were then taken away from the tissue by enzymatic digestion using elastase of 0.56 u/ml in tris buffer solution at 37°C with gentle stir. The tissues were incubated in 80% ethanol solution for 3 days at 37°C to remove phospholipids from the inside. The obtained tissues were subjected to histological and biomechanical studies. The vascular grafts made of miniature pig descending aorta were transplanted allogeneically.

There was no thrombus on the intimal surface and aneurysm formation even after 3 months of the implantation. A large amount of the cell migration into the graft was observed. These cells were

(HA) nano-powder, and the suitability of this material for cell adhesion was evaluated.

**Methods:** Poly(propylene fumarate)(PPF)/diethyl fumarate(DEF) composite possesses compressive mechanical properties that are similar to those of human trabecular bone [3]. And HA is one of the main components of bone. Briefly, PPF was synthesized via a condensation reaction, according to Gerhart et al. [4]. After synthesis, DEF was added to reduce the viscosity. Finally, a photo-initiator (dimethoxy-phenyl-acetophenone) and HA were mixed with the synthesized photopolymer. MSTL was performed using an Ar ion laser, an x-y-z stage, and optical components. This method was used to fabricate 3-D scaffolds by solidifying layers.

**Results and Discussion:** Scaffolds containing micro/nano structures were successfully fabricated using MSTL and PPF/DEF-HA. The pores and lines of the fabricated scaffold were regular and all the pores were connected. HA powder generated the micro/nano-size topology well. After scaffold fabrication, MC3T3-E1 cells were seeded within the scaffolds and cell adhesion was observed. Our results indicate that scaffolds containing HA powder can be applied to bone tissue regeneration.

#### References

1. Y. Wan, et al.,(2005), *Biomaterials*(26), 4453-4459.
2. G. Wei, et al.,(2004), *Biomaterials*(25), 4749-4757.
3. J.P. Fisher, et al.,(2002), *Biomaterials*(23), 4333-4343.
4. D.D. Frazier, et al.,(1997), *J Biomed Mater Res*(35), 383-389.

#### (335) Prelamination of Keratinocytes, Fibroblasts, Adipocytes and EPCs to Create an Entirely Autologous, Full Thickness and Vascularised Skin Substitute: Are We There Yet?

Van den Berge S., Hendrickx B., Dickens S., Vranckx J.J.

Laboratory of Plastic Surgery and Tissue Engineering Research, Department of Plastic & Reconstructive Surgery, KU Leuven University Hospital, Katholieke Universiteit Leuven, Herestraat 49, B-3000, Belgium

Skin substitutes come in a dizzying variety nowadays. None, however, has managed to perfectly replace full thickness skin. Rejection and infection are, on more than one occasion, the culprits for skin substitute failure. It is commonly believed that the exclusion of foreign-origin materials and an improved vasculature in the skin substitute are factors that may aid substantially in achieving better results. We therefore focus on constructs that come with the potential for vascularisation, and are made up entirely of the host's own expanded cells.

Fibroblasts, keratinocytes and adipocytes were isolated from small skin fragments and expanded *in vitro*. After 3-4 passages, the cells were left to proliferate and form multi-layers for 3-4 weeks in a differentiation medium consisting of a DMEM/Ham's F12 mixture, supplemented with foetal calf serum or a serum replacement and various nutrients and growth factors. In the meantime, endothelial progenitor cells (EPCs) were harvested from peripheral blood samples, isolated and cultured into stable cell lines of late outgrowth EPCs (with a large proliferation capacity).

The next step was a classic "mix 'n' match": laminated fibroblast and keratinocyte sheets were superimposed, with different concentrations of EPCs sandwiched between them, and adipose cell

(multi)layers underneath, to investigate the cells' behaviour, proliferation and differentiation, and the EPCs' ability to form vessel-like tubular structures.

The aim of this research project is to further investigate the concept of prefabrication and -lamination for tissue engineering of full-thickness skin substitutes.

#### (336) Preliminary Study of *In Vitro* Niche Effect on Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cells to Cardiomyocytes-Like Cells

Miskou A.<sup>1,3</sup>, Terada D.<sup>2</sup>, Ebashi T.<sup>2</sup>, Fujisato T.<sup>2</sup>, Mahara A.<sup>1</sup>, Uyama H.<sup>3</sup>, Yamaoka T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Japan

<sup>2</sup>Department of Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Japan

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, Osaka University, Japan

The adult heart does not regenerate after injury because the cardiac myocytes are terminally differentiated and lost their growth activity. Injection of the bone marrow stem cells into infarcted region is one of the most promising solutions proposed, and recent evidence has suggested that stem cell can differentiate into cardiomyocyte either *in vivo* or *in vitro*. However the efficiency of the differentiation process is still very low. In this study, we investigated the effect of various culture conditions including differentiation medium, cell culture matrices, and culture system (suspension or monolayer culture and static culture or dynamic culture) on the differentiation of rat mesenchymal stem cells (rMSCs) to cardiomyocytes-like cells under *in vitro* condition. First, the effect of 5-azacytidine, vitamin-C and human basic fibroblast growth factor (b-FGF) added to Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose (DMEM-LG) in static culture was determined. The rMSCs were obtained from femurs and tibias of male Sprague-Dawley (SD) rats (2-week-old) using our own method. rMSCs ( $6.0 \times 10^5$ ) at the third passage as seeded in the culture dish were then exposed to differentiation medium for 24 hours on day-3 of culture. The RT-PCR result shows that the expression of  $\alpha$ -actin gene has increased to a peak value after 2 weeks induced by 5-azacytidine, vitamin-C, and b-FGF but the expression of MEF2C gene was low. Then, we treated the rMSCs suspended in DMEM containing 5-azacytidine, vitamin-C, and b-FGF. As a result, the expression of  $\alpha$ -actin gene was forty times higher than control, whilst the MEF2C was forty times higher than the control. The effect of the other "niches" will be also discussed.

#### (337) Preparation and Characterization of Cornea Decellularized by Ultra High Pressurization

Kimura T., Funamoto S., Hashimoto H., Sasaki S., Mochizuki M., Fujisato T., Kobayashi H., Kishida A.

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

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan



jejunooanastomosis during Whipple procedure. **Methods:** From December 1998 till December 2005 35 patients had Whipple procedure with the use of fibrin glue or TachoComb in the site of pancreatico-jejunoanastomosis (15 and 20 patients respectively). All patients had the cancer of pancreatic head. The mean age, sex ratio, disease history and concomitant diseases, and the technique of pancreatico-jejunoanastomosis (end-to side, two layers) in the both groups were similar. During surgery were used 5 ml of sealant or 1 large fleece of TachoComb. **Results:** The intraoperative time for additional manipulation was high for sealant group (1.5 times in comparison to TachoComb). The intraoperative adhesion and sealing was better for sealant group (in 9 cases of TachoComb the material was not fixed to the line of anastomosis; no such cases in the sealant group). There were 2 cases of pancreatico-jejunoanastomosis leakage in the TachoComb group, and the absence in the fibrin glue group. The first postoperative day of mean amylase level from the site of surgery (drainage fluid from the abdominal cavity) was 3 times high for TachoComb (66000 IU for TachoComb and 21500 IU for fibrin glue). **Conclusions:** These results show that if the surgeon decided to use any adhesive materials (as TachoComb or fibrin sealant) for the enforcement of pancreatico-jejunoanastomosis during Whipple procedure, the use of sealant is more preferable because its plasticity and temporary-time liquid condition, which help this material to penetrate to any deep layers of anastomosis.

### Regenerative Medicine/Tissue Engineering and Artificial Organs 1

#### G-076 CRUCIAL ROLE OF LEFT VENTRICULAR UNLOADING FOR CELL TRANSPLANTATION INTO DISEASED HEARTS

Satoshi Gojo<sup>1</sup>, Shunei Kyo<sup>2</sup>, Hideaki Yamabi<sup>3</sup>, Hiroshige Sato<sup>4</sup>, Xiao Sun<sup>5</sup>  
<sup>1</sup>Towa Hospital, <sup>2</sup>Saitama Medical School, <sup>3</sup>Saitama Medical Center, Japan

**Background:** Recently, we reported that the combination of left ventricular assist device and intracoronary mononuclear cell transplantation induced native cardiac resurrection to result in successful LVAD explantation. On the other hand, stem/progenitor cell transplantation in acute myocardial infarction or chronic heart failure without circulatory support showed only 5 to 10% up in ejection fraction at maximum. There is a significant difference between our experience and reported data in peer reviewed articles. So far, there is little information how conditions grafted cells can function effectively in injured organs. **Aim:** We hypothesized that LV unloading might be crucial role for transplanted cells to function well in diseased hearts. **Materials and Methods:** Beagle dogs were used in this study. Autologous mesenchymal cells were transplanted via coronary sinus in a retrograde fashion. The experiments were grouped to 4. 1: normal heart without LV venting, 2: infarcted heart without LV venting, 3: normal heart with LV venting, 4: infarcted hearts with LV venting. **Results:** We observed few grafted cells in hearts without LV venting. On the other hand, hearts unloaded by LV venting showed a robust accumulation of grafted cells. The major part of grafted cells found either adjacent to or integrated in the vessel wall, and minor part of grafted cells were detected dispersedly in the interstitial space of myocardium. **Conclusions:** These results suggested that LV loading reduction as a patient conditioning could be important for cell transplantation strategy in regenerative medicine.

#### G-077 DEVELOPMENT OF AN IMPLANTABLE SMALL CAMERA FOR CONTINUOUS OBSERVATION OF ANGIOGENESIS IN VIVO

Y. Inoue<sup>1</sup>, A. Sugino<sup>1</sup>, I. Saito<sup>1</sup>, H. Nakagawa<sup>1</sup>, N. Mitsumune<sup>1</sup>, T. Isoyama<sup>1</sup>, H. Miura<sup>1</sup>, A. Kouno<sup>1</sup>, T. Ono<sup>1</sup>, S. Yamaguchi<sup>1</sup>, W. Shi<sup>1</sup>, A. Kishi<sup>1</sup>, T. Chinzei<sup>1</sup>, Y. Mitamura<sup>2</sup>, S. Murabayashi<sup>2</sup>, M. Shishihara<sup>2</sup>, K. Imachi<sup>3</sup>, Y. Abe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The University of Tokyo, Tokyo, <sup>2</sup>Hokkaido University, Hokkaido, <sup>3</sup>Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization, Miyagi

**Background:** Angiogenesis is essential for successful tissue-engineered artificial organs and regenerative medicine. However, the mechanisms and conditions required for angiogenesis have not been disclosed yet. In this study, we monitored growth of blood vessels in a scaffold in vivo with the developed camera to study the angiogenesis mechanism. **Methods:** We developed the device consisting of a scaffold and a CMOS camera. The scaffold

is made of poly glycol acid (PGA: Gunze, NV-N-015N, Kyoto, Japan), and the thickness is 0.3 mm. The camera is a 1/3-inch CMOS camera and has the autofocus function (Hitachi Maxell, PM7, Tokyo, Japan). We implanted the camera device in the latissimus dorsi muscle of an adult female goat. We observed the growth of the blood vessels on the scaffold. After the end of the experiment, we stained the tissues in scaffold by hematoxylin and eosin stain. **Results:** We could observe continuously the state of the blood vessels growing for 3 weeks from the start of the experiment. We observed a lot of capillaries growing during the period of tissue growth. But when the tissue growth stopped, many capillaries disappeared and some arterioles grew. **Conclusions:** We observed the changes of vessels and tissues growing on a scaffold in vivo. An implantable device consisting of a small camera and a scaffold is useful for studying angiogenesis in vivo.

#### G-078 WHICH REGENERATIVE MEDICINE IS MORE BENEFICIAL AS A COMBINATION THERAPY FOR A HEART FAILURE THAT NEEDS MECHANICAL ASSIST CIRCULATION?

Y. Takewa<sup>1</sup>, E. Chemaly<sup>1</sup>, L. Lifan<sup>1</sup>, M. Takaki<sup>2</sup>, Y. Taenaka<sup>3</sup>, E. Tatsumi<sup>3</sup>, R. Hajjar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA, <sup>2</sup>Nara Medical University School of Medicine, Nara, Japan, <sup>3</sup>National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

**Background:** Recently regenerative medicine is expected as a combination therapy for severe heart failure that needs mechanical assist circulation to increase the bridge to recovery rate. In this study, we examined which regeneration therapy is more beneficial. **Methods:** We chose bone marrow derived stromal cell (BMSC) transplantation and gene transfer of calcium handling protein as regenerative medicine. BMSCs were injected into myocardium of the adult goat hearts in which heart failure created with adriamycin infusion and left ventricular assist device (LVAD) was installed. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase (SERCA2a) gene carried by adenovirus were transferred in rat hearts in which heart failure was created with abdominal aortic-inferior vena caval shunt. **Results:** The BMSC group recovered better cardiac function compared to the control group. Wall thinning of the myocardium and LV dilatation were more suppressed in the BMSC group. The SERCA2a group improved in LV pressure and energy utilization in LV contraction compared to the non-SERCA2a group. **Conclusion:** Both BMSC transplantation and gene transfer of SERCA2a improved cardiac function in severe heart failure and can be the promising as a combination therapy with mechanical assist circulation.

#### G-079 CONTROL OF SKELETAL MUSCLE CELL CONTRACTION BY ELECTRICAL PULSE

K. Yamasaki<sup>1</sup>, H. Hayashi<sup>1</sup>, S. Uto<sup>2</sup>, T. Ebashi<sup>3</sup>, S. Hashimoto<sup>1</sup>, H. Tsutsui<sup>1</sup>, S. Mochizuki<sup>1</sup>, H. Kondo<sup>1</sup>, M. Yoshiura<sup>1</sup>, T. Fujisato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Biomedical Eng. Osaka Institute of Tech., Osaka, Japan, <sup>2</sup>Dept. Electrical and Electronic systems Eng. Osaka Institute of Tech., Osaka, Japan, <sup>3</sup>Dept. regenerative Medicine and Tissue Eng. National Cardiovascular Center, Suita, Japan

**Background:** Contractility of the tissue-engineered muscle with electrical signal has been required for the development of bio-actuator and muscle tissue regeneration. Although some investigators have already reported about the contraction of myotubes with electrical pulse, the strategy to improve their contractility has not been established. In this study, we discussed about the effect of variety of pulse stimulation on the contraction of skeletal muscle cells. **Method:** The C2C12 cells were seeded on various treated substrates and cultured in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum. When the C2C12 cells reached confluence, the medium was changed to the DMEM containing 2% horse serum to allow them to differentiate to the C2C12 myotubes. Electrical stimulation was performed to the C2C12 myotubes and their contraction was observed under the phase contrast microscope at 37°C. The variations were made on amplitude, pulse duration, and frequency of voltage of 0 V-30 V, 0 msec-100 msec, and 0.05 Hz-10 Hz, respectively. **Result:** The C2C12 myotubes contracted on collagen coated substrate at voltage up to 10 V at pulse duration up to 3 msec, and at frequency between 0.05 Hz to 4 Hz. The number of contracting tubes increased as frequency decreased. The motion of C2C12 myotube contraction depended especially on the pulse duration and frequency. **Conclusion:** It is indicated

that parameters of pulse duration and frequency of electrical stimulation are important for the control of myotube contraction.

#### G-080 OPTIMAL LAYERED IMPLANTATION OF AUTOLOGOUS MYOBLAST SHEETS FOR INFARCTED HEART

Naosumi Sekiya<sup>1</sup>, Shigeru Miyagawa<sup>1</sup>, Goro Matsumiya<sup>1</sup>, Takaya Hoashi<sup>1</sup>, Tatsuya Shimizu<sup>2</sup>, Terno Okano<sup>2</sup>, and Yoshiki Sawa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, <sup>2</sup>Department of Advanced Biomedical Engineering and Science, Graduate School of Medical Science, Tokyo Women's Medical University

**Background:** We have investigated that autologous myoblast sheets implantation improve the function of impaired myocardium. In this study, we evaluated the effect of increasing number of layer of myoblast sheets in infarcted heart. **Methods:** Left anterior descending coronary artery-ligated Lewis rat hearts received myoblast sheets which constructed with temperature-responsive, polymer-grafted cell-culture dishes. Forty rats were implanted myoblast sheets ( $3 \times 10^6$  cells per sheet) on the heart, randomly divided 4 groups (each group  $n = 10$ ), Sh1 group: one sheet, Sh3 group: three sheets, Sh5 group: five sheets and Sham group: only sham operation. We analyzed cardiac function by echocardiography and catheterization, RNA expression of soluble factor by RT-PCR, fibrosis, vascular density. **Results:** In echocardiography. Ejection fraction of Sh5 and Sh3 at 4 and 8 weeks significantly improved (Sh5 and Sh3 vs Sh1 and Sham, at 4 weeks: 50.4 and 45.7% vs 39.7 and 38.7,  $p < 0.05$ , at 8 weeks: 47.8 and 43.7% vs 38.2 and 37.2%,  $p < 0.05$ ). In catheterization study at 8 weeks, ESPVR of three groups also significantly improved. (Sh5 and Sh3 vs Sh1 and Sham,  $p < 0.05$ ). The expression of mRNA of SDF-1, Midkine, Thymosin B4, and B10 was most upregulated in Sh3 group among all the groups. In histology, % fibrosis decreased both in Sh5 and Sh3, and vascular density increased in Sh5 and Sh3 (vs Sh1 and Sham,  $p < 0.001$ ). **Conclusion:** Five layered myoblast sheets implantation seems to be favorable with more improvement of cardiac function, angiogenesis, less fibrosis.

#### G-081 THERAPEUTIC ANGIOGENESIS USING PERIPHERAL BLOOD STEM CELL

Takashi Horie, Masahiro Yamada, Yoshihiro Abe, Ichiro Tsuda, Jun-ichi Iida, Hiroshi Sakata, Kazuhiko Onodera, Hidenori Furui, Tohru Tamaki, Kazutaka Kukita, Jun-ichi Meguro, Motoki Yonekawa, Akio Kawamura  
 Department of Surgery, Sapporo Hokokyu Hospital, Sapporo, Japan

Therapeutic angiogenesis using bone marrow cell transplantation was reported and this therapy was useful for arterio sclerosis obliterans (ASO). We attempted the same procedure using peripheral blood stem cell collection (PBSCC). One hundred and thirty patients were included in this study, 90 were hemodialysis patients. They were all peripheral arterial disease (PAD) patients, 120 were of lower limbs and 10 were of upper limbs. The patients were given  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  G-CSF for 4 days subcutaneously. PBSCC was done on day 4. For each patients, 8.3 L peripheral blood was treated with an apheresis machine (CS-3000 or Spectra) and  $3.5 \times 10^7$  CD34 cells were harvested with mononuclear cells, red blood cells and platelets on average. We did not purify the CD34 cells using magnetic beads method and the CD34 enriched fluid (56.8 ml) was injected at 114 points of limb muscle on the same day. Thirty seven patients recovered. The disappearance of a foot ulcer continued for five years. The symptoms of another 39 patients did not change but their limbs were rescued. And 54 patients had amputations because their ulcers were necrotic and infected.

#### G-082 ANALYSIS OF MECHANICAL CHARACTERISTICS OF ENGINEERED CARDIAC TISSUE BASED UPON THE BEATING DISPLACEMENT

Zhonggang Feng<sup>1</sup>, Mitsuo Umezu<sup>2</sup>, Yasutomo Nomura<sup>3</sup>, Tatsuo Kitajima<sup>1</sup>, Takao Nakamura<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Yonezawa, Japan, <sup>2</sup>Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>Graduate School of Medical Science, Yamagata University, Yamagata, Japan

**Background:** Engineered cardiac tissue (ECT) can be constructed by embedding cardiomyocytes in a collagen gel. Understanding its mechanical

characteristics is extremely important for the enhancement of beating force and the application of the ECT in pharmacological test. **Methods:** A parallel three-element constitutive model for collagen-gel based engineered cardiac tissue is proposed; which consists of an active contractile element, an elastic element, and a viscous dashpot. An original analytical method is developed to identify the characteristics of the contractile element, the elasticity of the elastic element, and the viscosity of the dashpot by analyzing the beating displacement of the engineered cardiac tissue. **Results:** The results show that the engineered cardiac tissue has of 18.20 kPa elasticity,  $5.49 \times 10^2$  Pa-s viscosity, and the characteristics of the contractile element that the occurring of the maximum contractile force corresponds to the maximum contractile strain rate, close but precede the maximum contractile strain. Small contractile force at micro Newton level can be detected by this analytical method. The value of the elasticity coefficient is examined to be valid, and the small viscosity coefficient may imply the myofilament sliding effect existing.

**Conclusion:** Beating displacement analysis method is proved to be an effective way to investigate the mechanical properties of collagen-gel based engineered cardiac tissue.

The mechanical characteristics of the collagen-gel based engineered cardiac tissue is firstly revealed by the study.

**Keywords:** parallel three-element model, engineered cardiac tissue, characteristics of contractile force, viscoelasticity.

#### Rotary Blood Pump

#### G-083 INFLUENCES OF HYDRAULIC FORCES ON MOTION CONTROL OF A MAGNETICALLY LEVITATED CENTRIFUGAL BLOOD PUMP

C.N. Pai<sup>1</sup>, T. Shinshi<sup>2</sup>, J. Asama<sup>3</sup>, P. Keogh<sup>4</sup>, S. Takatani<sup>5</sup>, A. Shimokohbe<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan, <sup>2</sup>Precision and Intelligence Laboratory, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan, <sup>3</sup>Department of Electrical Engineering, Tokyo University of Science, Chiba, Japan, <sup>4</sup>The Centre for Power Transmission and Motion Control, University of Bath, Bath, United Kingdom, <sup>5</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

We developed a compact centrifugal blood pump, with a two-degree-of-freedom controlled radial magnetic bearing, and a built-in brushless motor having a Halbach PM array in the rotor. Since the impeller is passively supported by magnetic coupling of permanent magnets in the axial and tilt directions, the stiffness in these directions is lower than in radial direction. The hydraulic forces generated by the secondary flow through the bottom of impeller dislocate the impeller. Thus the rotational position signal of the rotor, which is measured by detecting the magnetic poles with Hall elements under the Halbach PM array, is affected by the dislocation, and the rotational control of the rotor becomes unstable due to the signal error. The purpose of this study is to evaluate and compensate the influences of hydraulic forces on the rotational control of magnetically levitated impeller.

First, we measured the relationship between axial displacement, rotation speed and head pressure. We observed that axial displacement of the impeller is only related with rotation speed, receiving little influence from variation of head pressure. With these results, we compensated the instability of motor control by conditioning the Hall element signal according to the rotation speed. As a result, the pump efficiency increased from 6.7% to 13.9% at 5 L/min, 100 mmHg. This difference is caused exclusively by the motor power consumption because the positioning accuracy (peak-to-peak vibration amplitude:  $35 \mu\text{m}$ ) and power consumption (1.8 W) of radial magnetic bearing in both situations were the same.

#### G-084 ANTI-THROMBOGENIC PROPERTY OF MERA MONOPIVOT CENTRIFUGAL PUMP

T. Yamane<sup>1</sup>, H. Kogure<sup>2</sup>, M. Nishida<sup>1</sup>, O. Maruyama<sup>1</sup>, R. Kosaka<sup>1</sup>, H. Kawamura<sup>2</sup>, Y. Yamamoto<sup>3</sup>, K. Kuwana<sup>3</sup>, Y. Sankai<sup>4</sup>, T. Tsutsui<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>AIST, <sup>2</sup>Tokyo Univ. of Sci., <sup>3</sup>Senko Med. Instr. Mfg. Co. Ltd., <sup>4</sup>Univ. of Tsukuba, Japan

**Purpose:** In vitro thrombogenic tests, proposed by Maruyama, were conducted for a MERA monopivot centrifugal pump newly developed for circulatory assist and open heart surgery. The impeller, with 4 straight paths

## 電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御

Control of skeletal muscle cell contraction by electric pulse

○林宏行<sup>1</sup>, 山崎健一<sup>1</sup>, 小林裕之<sup>1</sup>, 宇戸禎仁<sup>1</sup>, 江橋具<sup>2</sup>, 近藤英雄<sup>1</sup>, 橋本成広<sup>1</sup>, 藤里俊哉<sup>1</sup>

1. 大阪工業大学大学院工学研究科, 2. 国立循環器病センター研究所 再生医療部

○Hiroyuki HAYASHI<sup>1</sup>, Kenichi YAMASAKI<sup>1</sup>, Hiroyuki KOBAYASHI<sup>1</sup>, Sadahito UTO<sup>1</sup>, Tomo EHASHI<sup>2</sup>, Hideo KONDO<sup>1</sup>, Shigehiro HASHIMOTO<sup>1</sup>, Toshia FUJISATO<sup>1</sup>

1. Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology,

2. Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center

## 1. 緒言

マイクロマシン技術は医療に変革をもたらすようなものとなりつつあり, 既に医療関連機器への応用が始められている. マイクロマシンを駆動させるためにはアクチュエータが必要となるが, 従来の機械式アクチュエータは大きく, 電源が必要であることから, 小さく, 小電力で駆動するアクチュエータの開発が望まれている.

生体筋は機械的アクチュエータとは異なり, 主に化学エネルギーを機械エネルギーに変換して駆動するため, 小型化および省電力化が可能となる. このことから, 筋芽細胞を培養することによって作製した培養筋をバイオアクチュエータとして利用することが考えられる. 培養筋を用いたバイオアクチュエータを開発するためには, 培養筋の収縮弛緩を制御する必要がある. これまで筋管細胞や培養筋の収縮弛緩を電気パルスで制御する試み<sup>1,2)</sup>が報告されているが, その刺激条件と収縮弛緩との関係は未だ明らかでない. そこで本研究では, 培養筋の収縮を制御するための電気パルスの刺激条件について検討した.

## 2. 実験方法

## 2-1. 細胞培養

マウス横紋筋由来株化細胞 C2C12 を,  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 60 mm コラーゲンコートディッシュ (Dish) と Type-I コラーゲンゲルを形成したディッシュ (Gel) に播種した. 培養液には 10 % 牛胎児血清を含む High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を用い, 37°C, CO<sub>2</sub> 5 % の環境下で 4 日間培養を行った. その後, 筋芽細胞の融合を促進させるため, 培養液を 7 % 馬血清を含む DMEM に変更し, 培養を行った. 培養液の交換は 2 日毎に行い, その際に位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察した.

## 2-2. 電気刺激実験

パルス電気刺激が細胞の収縮弛緩に及ぼす影響を調べるため, 培養 10 日目に電気刺激実験を行った. 互いに向き合うように白金平板電極をディッシュの端部に設置し, Waveform generator を用いて培養液中にパルス電圧を印加した. 入力電圧, 周波数およびパルス幅を変化させ, C2C12 細胞の動態変化を位相差顕微鏡にて観察した.

## 2-3. 細胞の収縮弛緩の評価

電気刺激に対する細胞の収縮弛緩の応答性を評価するため, 画像解析を行った. コンピュータに取り込んだ動画をフレームごとの静止画にし, 画像をグレースケールに変換した. 収縮弛緩する細胞の輪郭付近周辺を選択し, その領域のグレースケールの平均値を求めた. さらに, 平均値の時間変化をフーリエ変換し, 周波数スペクトルを求めた.

## 3. 結果

Dish および Gel 共に, 培養 6 日間から細胞が融合し筋管細胞に分化していることが確認できた.

パルス電気刺激したところ, 入力電圧 10V<sub>p-p</sub> から 45V<sub>p-p</sub> の間において, 周波数 0.5 Hz から 2 Hz の範囲で同期して収

縮弛緩する細胞が観察された. しかし, 3 Hz から 10 Hz の範囲では強縮が生じた. 入力電圧を高くし, パルス幅を長くすると収縮弛緩する細胞数が増加した. 収縮弛緩する細胞数は, Dish より Gel のほうが多かった.

Fig. 1 に, Dish と Gel 上で伸展した筋管細胞の長軸方向と平行 (Parallel) および垂直 (Vertical) に周波数 1 Hz の電圧を印加した場合の細胞動態を解析した結果を示した. Parallel では周波数 1 Hz において周波数スペクトルのピークが見られたことから, 細胞が 1 Hz で収縮弛緩していることがわかった. しかし, Vertical ではピークは見られなかった.

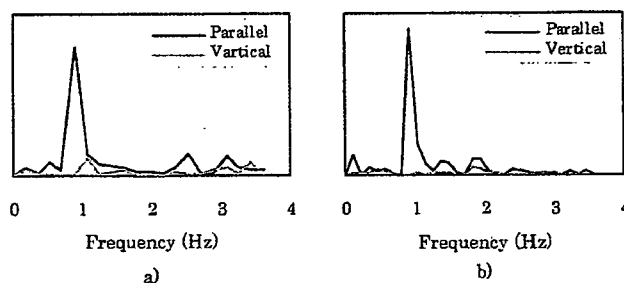


Fig. 1 Spectrum of C2C12 contraction by electric pulse. a) Dish, b) Gel

## 4. 考察

Gel の筋管細胞が Dish と比較して多く収縮弛緩したことは, 足場の剛性の違いが原因であると考えられる. また, 入力電圧およびパルス幅を変化させることによって, 収縮弛緩する細胞数が変化することは, 細胞に与えるエネルギーが変化したためと考えられる. さらに, 電界方向が細胞の伸展方向に対して平行方向のとき, 垂直方向より多くの筋管細胞で収縮弛緩が見られたことは, 電気刺激に対する筋管細胞の応答性に異方性があることを示唆しており, 今後さらに詳しく検討する必要があると考えられる.

## 5. 謝辞

本研究は文部科学省学術フロンティア「培養筋の医工学応用」の助成より行われた.

## 6. 参考文献

- (1) Mario Marotta et al. Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells. *Bio Techniques* 2004; 36: 68-73
- (2) Robert G. Dennis et al. Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000; 36: 327-335