

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA (pDNA) released from PVA/pDNA hydrogels with PVA concentrations of 5% and 10% w/v produced by pressurization at 10000 atm and 37°C for 10 min after immersion in phosphate-buffered saline for 12 and 48 h

from the PVA/DNA hydrogels was stable. Two bands of linear and circular plasmid DNA were observed with 5% w/v PVA/DNA hydrogel, while circular plasmid DNA was released from the 10% w/v PVA/DNA hydrogel, indicating that the linear form of plasmid DNA tends to interact more strongly with PVA than the circular plasmid DNA.

Conclusions

Novel PVA/DNA hydrogels crosslinked physically by hydrogen bonds were developed using UHP technology. DNA released from the hydrogels was controlled by varying the PVA concentration and pressurization conditions, such as the level and duration of pressure used to form the hydrogels. The demonstrated stability of the DNA released from the hydrogels suggests that PVA/DNA hydrogels have potential as a candidate for gene delivery.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, of Japan and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. We thank Kuraray, Co., Ltd., for supplying the poly(vinyl alcohol).

References

- Nowak T, Nishida K, Shimoda S, Konno Y, Ichinose K, Sakakibara M, Shichiri M, Nakabayashi N, Ishihara K. Biocompatibility of MPC: in vivo evaluation for clinical application. *J Artif Organs* 2000;1:39–46
- Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet* 2005;6:299–310
- Zhang S, Xu Y, Wan B, Qiao W, Liu D, Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release* 2004;100:165–180
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60:247–266
- Dufes C, Uchegbu IF, Scatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:2117–2202
- Kimura T, Yamaoka T, Iwase R, Murakami A. Effect of physico-chemical properties of polyplexes composed of chemically modified PL derivatives on transfection efficiency in vitro. *Macromol Biosci* 2002;2:437–446
- Futaki S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:547–558
- Reschel T, Koňák Ā, Oupický D, Seymour LW, Ulbrich K. Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. *J Control Release* 2002;81:201–217
- Elouahabi A, Ruyschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther* 2005;11:336–347
- Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Kriegelstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2006;24:1121–1131
- Choksakulnimitr S, Matsuda S, Tokuda H, Takakura Y, Hashida M. In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. *J Control Release* 1995;34:233–241
- Sakurai K, Mizu M, Shinkai S. Polysaccharide–polynucleotide complexes. 2. Complementary polynucleotide mimic behavior of the natural polysaccharide schizophyllan in the macromolecular complex with single-stranded RNA and DNA. *Biomacromolecules* 2001;2:641–650
- Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A. Novel PVA-DNA nonparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery. *Mater Sci Eng C* 2004;24:797–801
- Doi E, Shimizu A, Kitabatake N. Gel-sol transition of ovalbumin by high pressure. In: Hayashi R (ed) *High pressure bioscience and food science*. Kyoto: Sanei Press, 1993;171–177
- Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotech* 1999;17:551–554
- Chun KW, Lee JB, Kim SH, Rark TG. Controlled release of plasmid DNA from photo-cross-linked pluronic hydrogels. *Biomaterials* 2005;26:3319–3326
- Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, Sumita Y, Hisada A, Itoh H, Nagai Y, Terada M. New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med* 1999;5:707–710
- Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y. Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *Biomaterials* 2005;26:3319–3326
- Kushibiki T, Tomoshige R, Fukunaka Y, Kakemi M, Tabata Y. In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. *J Control Release* 2003;90:207–216
- Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato K, Uchino Y, Kato M, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2006;76B:56–63
- Hyon SH, Cha WI, Ikada Y. Preparation of transparent poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer Bull* 1989;22:119–122
- Yamamoto K, Furuzono T, Kishida A, Mustuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y. Formation of a supramolecular assembly of poly(vinyl alcohol) by ultrahigh pressure. Meeting Report of the Poval Committee 2002;121:25–26
- Walter E, Moelling K, Pavlovich HP. Microencapsulation of DNA using poly(D,L-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics. *J Control Release* 1999;61:361–374

繊維と線維(生体線維の洗浄と再生医療への展開)

Textile Fiber and Medical Fiber

澤田和也・寺田堂彦・藤里俊哉

1. はじめに

衣料用繊維素材は、植物や動物等の天然由来のものから、ナイロンやポリエステル等に代表される人工的なものまで、その種類が極めて多岐に渡っている。製造・加工技術の著しい進歩により、高機能化された繊維製品も多く登場し、我々の衣生活スタイルも大きく変化してきた。近年、繊維製品は工業・産業資材等にも広く応用化されていることは周知の通りであるが、それでも“繊維=衣料品”のイメージが強いことに変わりない。ここでは視点を少し変え、一般に殆ど認識されていない動物由来繊維の一種を紹介したい。動物由来繊維として連想できるものは、獣毛や絹糸等の体外で採取される蛋白質繊維であろう。しかし実際には、体内にも同様の線維が存在している。ここで、“繊維”と“線維”の単語を使い分けたが、その差に大きな意味はない。慣例的に、衣料分野では“繊維”が、医療分野では“線維”が用いられている。英語に訳せば何れも fiber であり、「細くて長いもの」という定義で本質的に同じである。さて、体内に存在する線維として、最も理解し易い例として血管を挙げることが出来る。実際、繊維状の生体適合性高分子材料を用い、人工血管を造形することも多い。図1に血管の概略図を示した。血管組織を大雑把に見ると、遺伝情報を含む生物体の構成単位である細胞、それを支持して

いる細胞外マトリックスから成る。さらに、細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞接着性蛋白質と、コラーゲン及びエラスチンを主とする線維性蛋白質から構成されている。従って、血管組織から細胞や接着因子を除去すれば、最終的にはコラーゲン線維およびエラスチン線維が残ることになる。上述した生体内の線維とは、これらを意味しており、体の部位により組成は異なるが、脊椎動物の身体の構造要素の主体である。ここで紹介させて頂く線維のテーマは、これら生体内線維を再生医療で応用化しようとする研究例である。

2. 研究背景

我々の体内に疾病組織が生じた場合、その回復を図る手段として最も望ましいことは、自己治癒により組織そのものを治癒化させることである。しかし、欠損もしくは機能不全に陥った組織に対しては、代替物との置換、つまり“移植”という手段も適応される。筆者らの研究チームが対象とする組織は心臓弁であるが、これについても同様である。現在、心臓弁置換の代替物には、パイロライト製の機械弁を用いるのが主である。最近では、一生の使用に耐え得る強度を有する製品も開発されている。しかし、これらの機械弁にも多くの問題が含まれている。例えば、生涯にわたる抗血栓剤の服用は、安全性や経済面において問題が残る。

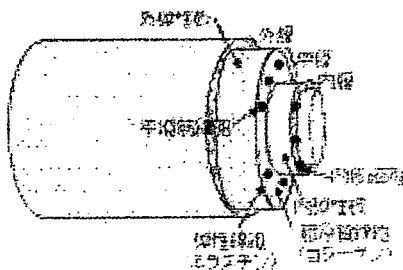
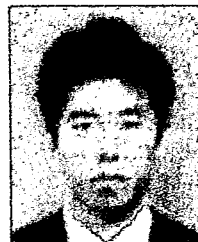


図1 血管構造の概略図



DOHIKO TERADA
大阪工業大学 工学部 博士研究員
博士(工学)
〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1
〈専門〉高分子材料加工
〈趣味〉読書



KAZUYA SAWADA
大阪成蹊短期大学 総合生活学科
准教授 博士(工学)
〒533-0007 大阪市東淀川区相川3-10-62
Tel: 06-6829-2561 Fax: 06-6829-2579
E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp
〈専門〉繊維加工、染色化学、コロイド化学
〈趣味〉スキー、旅行



TOSHIYA FUJISATO
大阪工業大学 工学部 教授 工学博士
〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1
Tel: 06-6954-4746
E-mail: fujisato@bme.oit.ac.jp
〈専門〉再生医工学、組織工学
〈趣味〉旅行計画

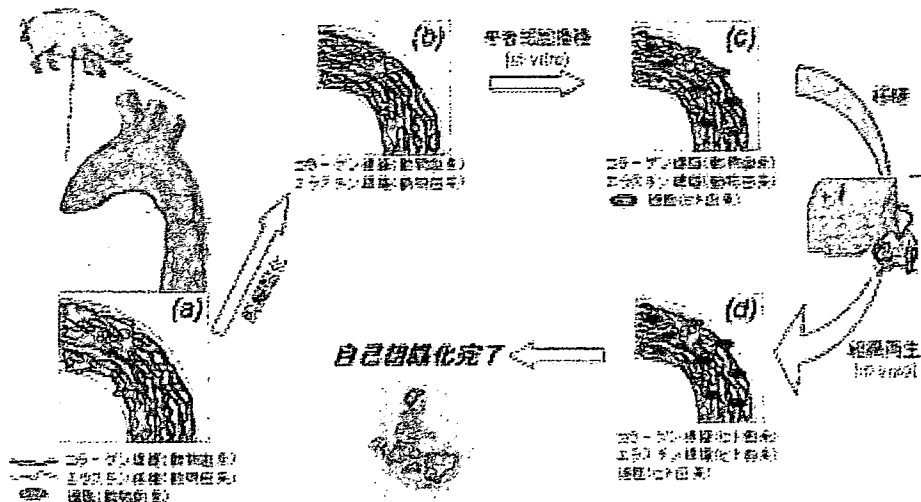


図2 下行大動脈をモデルとした生体線維による再生医療

また、サイズが永久に不変なため、小児患者では成長と共に再手術が避けられない。一方、ヒトから提供される心臓弁であれば、機能面では好都合である。しかし、ドナーの絶対的な不足は今後も解消の見込みが無い。そこで近年、置換代替物として動物由来の心臓弁を利用するという、両者の中間に位置する検討が進められている。図2は、それらの概念図であり、簡略のため心臓弁ではなく下行大動脈をモデルとして示した(a)。欠損した組織を医療用動物由来のものと置換するが、その際に動物由来細胞を除去(脱細胞)し、移植の足場となる線維組織のみの構造体(スキャフォールド)を作成する(b)。次に、患者から採取した細胞を生体外にてスキャフォールドへ播種・培養させる(c)。この際、細胞のスキャフォールドに対する親和性・接着性を高めるため、必要に応じてスキャフォールドに対し表面加工を行う。この過程においては繊維表面加工の技術が活かされている。その後、外科的にスキャフォールドの移植を行うが、患者自身の細胞を含む組織であるので、拒絶反応は大幅に低減される。一方、スキャフォールドである線維組織そのものは、異種由来であることから、移植後長年をかけて徐々に分解され、代わりにヒト由来の線維組織が再生する(d)。最終的には患者自身の組織で置換され自己組

織化が完了する。

この概念では、血管はもちろん、心臓弁や気管など多くの組織に適応可能なことから応用性が高い。さらに、極めて複雑な構造の生体組織を造形する必要が無い。一方、異種由来組織を用いる場合、前記のように免疫反応を無くすためにドナー由来細胞を除去し、線維組織のみにすることが必須となる。換言すれば、摘出組織から細胞という不純物を洗浄除去することになる。興味深いことに、この操作は、衣類の洗浄と同様、界面活性剤による洗浄が一般的である。本稿では血管組織を例として、洗浄により細胞を洗い流し、スキャフォールドを得るための手段について、筆者らの研究成果も交えて紹介する。

3. 生体線維の洗浄手法

— 界面活性剤/酵素併用による洗浄法 —

この手法は、現在最も一般的に行われる手法であり、図3にその概略を示した。界面活性剤水溶液による洗浄効果を高めるため、ビルダーとして酵素を添加する場合もあり、衣料の洗浄と原理は全く同じである。ただ、使用される界面活性剤は SDS や TritonX-100 が主であり、最適洗浄効果を考えた界面活性剤のスクリーニングは皆無に近い。また、

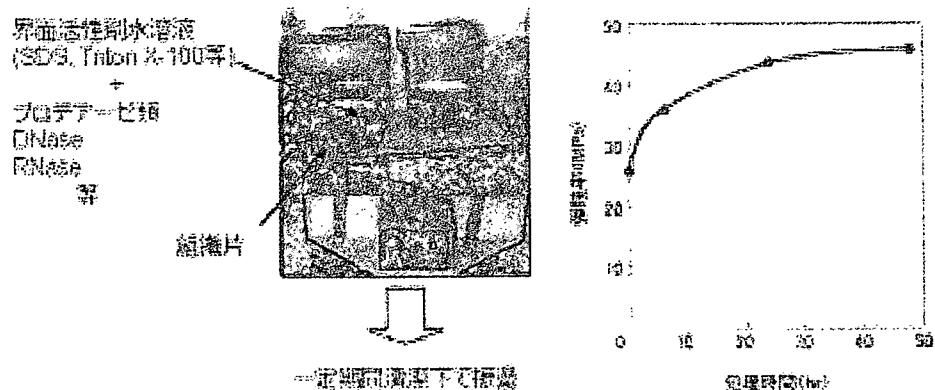


図3 界面活性剤による脱細胞化 (左: 洗浄手法 右: 処理前後の力学特性変化)

酵素には線維組織を加水分解し、細胞を除去し易くするため、プロテアーゼを用いることもある。しかし、これも実際にはトリプシンやキモトリプシンの利用が通例であり、それ以上の工夫は殆どない。衣料洗浄と異なる点は、DNAやRNAの分解を目的として、DNaseやRNaseを添加するケースがあることである。この様な洗浄により、組織中の細胞が洗い流され、最終的にコラーゲン線維やエラスチン線維のみが維持される。この手法では、一連の操作に要する時間がおおよそ数日間とされる。これは、界面活性剤除去(すすぎ洗い)のための十分な時間も必要なためであり、この点においては衣料の洗浄と大きく異なる。しかしながら、十分な“すすぎ洗い”をしたとしても、線維に吸着した界面活性剤の全量を除去することは困難である。さらに、これらの界面活性剤は何れも細胞毒性を示すことから、僅かな組織内残存も好ましくない。また、同図右に示すように、界面活性剤処理により線維組織の力学特性が変化することも知られている。さらに、強度維持のためアルデヒドを用いた架橋処理が施されるのが通例であるが、生体吸収性の低下や後述する石灰化との関連が指摘されている。これらを総合的に考えると、同法による脱細胞化では、強度や毒性などの生体への安全性問題が残されていると結論せざるを得ない。現在、これらの欠点を補うため、電離活性線照射の併用等、種々の工夫も試みられている。

次に紹介する例は、これに替わる新たな手法として著者らの研究チームが開発している例である。

4. 超高静水圧印加法

界面活性剤による洗浄は、細胞を洗い流すという観点において大変優れた手法である。しかし、線維組織の硬化や、界面活性剤の残存が大きな問題である。そこで、その欠点を克服する手段として、超高静水圧印加処理を考案した。これは、試料に対しおおよそ10000気圧を等方的に10分間印加し、その後緩衝溶液下で洗浄するものである(図4上段)。この操作では、超高圧印加により細胞が破壊され、その後の水溶液洗浄で容易に細胞除去が可能になる。化学薬剤を用いない物理的手法であり、毒性面における生体へ

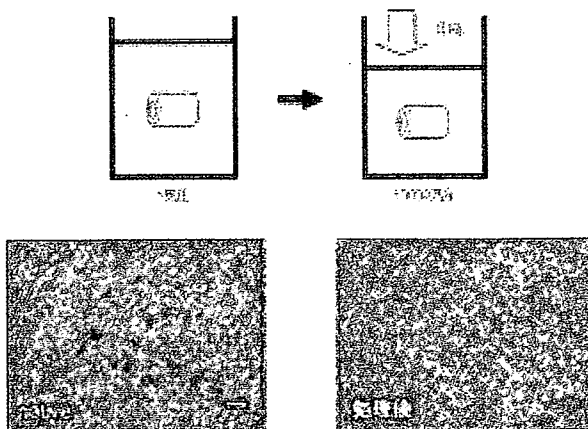


図4 超高圧印加処理と脱細胞化評価

の安全性が極めて高い。図4下段は同法で洗浄を行った結果であり、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行った写真である。尚、本稿における組織染色写真は、全て血管の断面部である。同写真左において native の血管では粒状に細胞が染色されているのに対し、処理後の写真では染色されておらず、効果的に脱細胞が行われている。また、コラーゲンやエラスチンの線維組織はそのまま維持されていることもわかる。又、内在性レトロウイルス(PERV)の残存もPCR法で評価を行ったが、それらが不活化されたことも確認している。次に、除去が困難とされる細胞膜リン脂質の残存を評価した結果を図5に示した。リン脂質は、移植後の石灰化の要因の一つとして問題視される物質であり、細胞除去の際に併せて評価すべき要因の一つである。図5上段の定量分析結果によると、超高圧印加処理のみではリン脂質が除去されていない。下段のTEM観察結果も同様の結果を示している。濃い黒に写っている部分がリン脂質であり、細胞膜及び核膜部分に集中している。本法は界面活性剤を用いない点で優れているが、逆に疎水性の高いリン脂質を単純に除去しにくいことも示している。しかし、この問題は比較的容易に解決可能であり、施圧後にアルコール浸漬することにより除去可能になる。同図の定量分析結果からも明らかな様に、殆どのリン脂質がアルコール処理により除去されている。しかし、極めて僅かな残存も確認される。TEM観察の結果では、核膜に起因するリン脂質の一部が残存している。極めて僅かな残存が生体にどのような影響を与えるかについては現段階では不明であるが、現在大動物を用いた長期移植経過観察中であり、今後の検討項目になるであろう。

5. 超臨界流体抽出法

超高圧印加法は、物理的手法であり界面活性剤処理やアルデヒド処理を含む工程に比べ、高い安全性が確保できる有効な手段である。しかし、リン脂質除去のために多段階工程が必要なこと、そして長期間(約3週間)の処理が必要という点で問題が残る。そこで、これらを改善する手法として研究を進めているのが、超臨界流体抽出法である。超

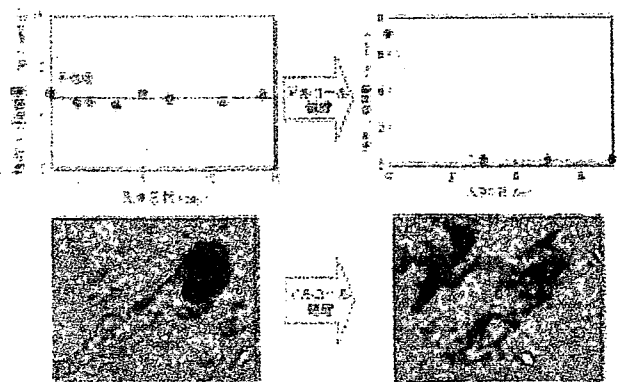


図5 脱細胞処理血管のリン脂質量変化
(上段：定量分析結果 下段：TEM観察結果)

臨界流体抽出は、既に製薬・食品分野で広く実用化されており、今も新たな応用化分野が広がっている。超臨界流体の最大の特徴は、圧力制御により媒体の誘電率を連続的に変化させることが可能な点である。つまり、単一媒体にもかかわらず、圧力変化のみで複数の溶媒特性を引き出すことが可能になる。誘電率変化の程度は媒体により異なるが、適切な媒体選択により複数の目的物質を選択的に抽出することが可能になる。現在、抽出において最も実用化例の多い媒体はCO₂である。本研究チームにおいてもCO₂を媒体の有力候補として検討している。超臨界CO₂の脱細胞化への利用における利点は幾つかある。その一つは、高い安全性である。脱細胞処理後、大気圧下に戻すことにより、CO₂は自然拡散し、組織内に残存することは無い。従って、毒性等の生体への危険性は無視出来る。もちろん、CO₂以外にも気体又は揮発性の高い液体を用いた場合でも同様である。また、CO₂に限っては臨界条件が温和なため、蛋白質が変性し難い条件で処理可能である。さらに、処理後の組織は、半乾燥または絶乾状態で得られ、長期保存が可能になる。次に、超臨界流体の持つ高い拡散性は、液体に比べ組織深部への浸透をはるかに容易にする。従って、溶液洗浄に比べ処理時間を著しく短縮出来る可能性を有する。以上より、同法での細胞抽出が可能であれば、従来法を凌駕する優れた脱細胞化手法と成り得る。

図6は、実際に超臨界CO₂を用いて処理を行った組織の処理前後のHE染色結果を示している。同図が示すように、CO₂単独では如何なる圧力領域でも効果的な細胞抽出は出来ていない。CO₂の場合、圧力変化に伴う誘電率変化の割合は比較的小さいことから、極性の高い細胞成分を溶解抽出することが困難なようである。しかしながら、極性を上げるためのエントレーナを少量添加した場合、抽出効果の大きな改善が見られる。エントレーナの存在により、混合流体は細胞抽出可能な溶媒特性へと変化している。特筆すべきは処理時間の短縮であり、この写真は15分処理の効果を示している。脱細胞効果を得るため、超高圧印加法では3週間、界面活性剤溶液洗浄でも数日間という期間を要したが、本法での15分間という時間は画期的な短縮である。一方、リン脂質の除去については完全除去には至っていないが、ある程度高い効果が得られることを確認している。現在、単一工程での完全除去を達成するための検討を進めている。

ここで紹介した結果は、CO₂とエントレーナの系であるが、現在他の媒体を単独を用いた場合の効果も検討している。今後、動物実験へ向けての最適媒体及び処理条件の決

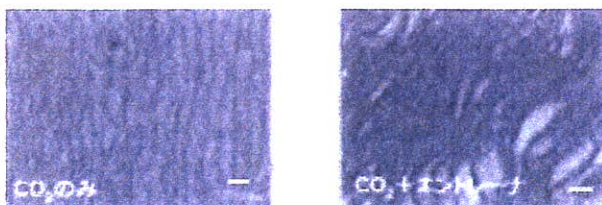


図6 超臨界二酸化炭素処理血管のHE染色比較

定が待たれる。

6. 防石灰化手段と血管の形態安定加工

ここまでは、脱細胞化手段についての紹介を行った。脱細胞化は、移植後急性の免疫反応を抑制することと密接に関連している。一方、実際の症例においては、移植後長期での移植組織の石灰化問題が存在する。残念ながら、石灰化の明確な機序については、現在も不明である。しかし、様々な要因が報告されており、その一つが上述の細胞膜リン脂質の残存である。他方、線維組織であるエラスチンの変性に起因するという報告も多い。本研究チームでも以前よりその機序について詳細な検討を重ねて来た。その結果、それらの単一要因ではなく、複合されて石灰化に繋がるという考えを持っている。従って、石灰化を誘引する可能性全てを消去することが、結果的に問題解決の近道であると考えている。そこで、脱細胞とは別要因である、エラスチン線維の変性に着目した検討結果を合わせて紹介する。

本研究手法を含め、組織に対し人為的(化学的又は物理的)処理を行えば、不可逆的にそれらの立体構造にミクロな歪みが生じる。我々も、機器分析により線維の立体構造に変性が生じることを確認している。エラスチン線維の変性を指摘する研究者は、このミクロな変性を挙げている。実際、石灰化部位はエラスチン線維に沿って生じる例が多い。ここで、同じ線維組織であるコラーゲンの変性が、石灰化と無関係とは断言出来ない。しかし、興味深いことに、実際の症例ではコラーゲン線維に沿った石灰化は殆ど見られない。さて、線維組織の変性であるが、現実問題として多少の変性無くして人為的処理を施すことは不可能である。そこで、単純な発想であるが、要因であるエラスチン線維を除去しコラーゲン線維のみの構造体にすれば、石灰化を抑制出来るかも知れない。

図7は、コラーゲン線維とエラスチン線維を区別するため、血管組織にElastica van Gieson (EVG)染色を行った例を示している。左図で濃く染色された線維がエラスチン、薄く写っている線維がコラーゲンである。エラスチン線維はコラーゲン線維と異なり、弾性に富み著しい伸張性を有する。その結果、常にストレスのかかる生体組織を柔軟に変形させ、耐久性を維持している。既に、エラスチン線維のみを選択的に除去する技術は幾つか報告されている。しかし、単純にそれを行うと別の問題が生じる。図8中央はエラスチンを除去した血管組織を示しているが、弾性の無くなった組織は、その構造が維持できない程度に変形する。

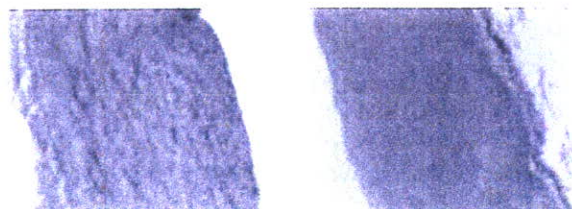


図7 血管組織のEVG染色写真
(左：native組織 右：エラスチン除去組織)



コラーゲン線維
エラスチン線維

コラーゲン線維のみ

コラーゲン線維のみ

図8 線維組織と形状変化
(左: native 中: エラスチン除去
右: 形態安定加工+エラスチン除去)

もちろん、力学強度測定を行うと、それが著しく低下する。そこで、コラーゲン線維のみでも形態を維持することが出来るよう、組織に対し形態安定加工を施す。衣類の形態安定加工は古くから行われているが、同様のことを生体組織に行うわけである。医用応用であること、および生体吸収性を考慮すれば、用いる薬剤や手法に工夫が必要であるが、原理は衣用と同じである。図7右の写真は、エラスチン線維が除去された血管のEVG染色結果である。同図左の写真と比較し、エラスチン線維が染色されていない。一方、残されたコラーゲン線維はそのまま維持されており、エラスチン線維のみが分解除去されている。また、図8右の写真は形態安定加工が施されたコラーゲン線維からなる血管である。コラーゲン線維のみであるにもかかわらず、血管の立体構造が維持されている。このコラーゲン線維血管の力学強度を評価した結果、破断強度に関しては native のそれと大差がないことも確認された。この様に、エラスチン線維を除去し、かつ力学強度を維持した構造体を形成することが出来た。そこで、この組織の石灰化抑制効果を評価するため、一定期間ラットの皮下へ組織を移植し、評価を行った。図9は、皮下移植した組織を12週間後に取り出し、石灰化評価のための von Kossa 染色を行った結果を示している。左写真は、native 血管をそのまま皮下移植した場合であり、明らかな石灰化が認められる。それに対し、右写真が示すように、エラスチン線維を除去した血管では

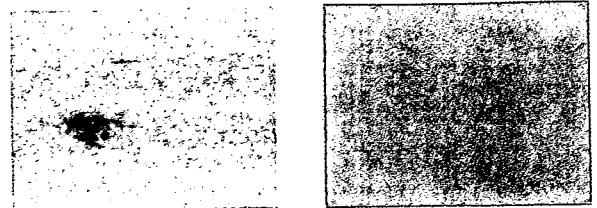


図9 ラットの皮下へ移植した血管組織の von Kossa 染色写真(12週)
(左: native 組織 右: 脱エラスチン組織)

石灰化が認められない。同様に行った他の組織の一部で軽度の石灰化が認められた例もあるが、native に比べ明らかな有効性が確かめられた。上記のように、石灰化は複数の要因が重なることで生じると考えられ、今後さらに夫々の要因を詳細に評価していくことが必要となる。

7. おわりに

生体内の線維と衣料用の繊維は全く異なるものとするのが通常であろう。実際、コラーゲン線維やエラスチン線維を、衣料用品に応用するという発想はない。“細くて長い”という表現で共通しているだけかも知れないが、実際に病理で評価される組織染色と繊維の染色は同じ原理である。また、本稿で述べた洗浄や加工についても、原理は何れも共通である。素材が共通していれば、結果的に加工技術の原理も共通するに至って当然かも知れない。しかし、全く内容の異なる分野でそれぞれ独自に開発されてきた技術が、結果的に基本原理が共通であったという点で筆者は興味深さを覚えている。本稿で紹介した内容については、欧米では既に臨床治療に入っている例もある。極めて優れた繊維科学の技術を有する我が国において、両分野の技術融合を加速させれば、技術開発の大きな飛躍に繋がるのではないだろうか。“医療の繊維”と“衣料の繊維”、語呂合わせのように見えるかも知れないが、その根底概念が共通していることを最後に強調したい。

第21回キチン・キトサンシンポジウム

主催：日本キチン・キトサン学会
共催：日本化学会、日本生化学会、日本生物工学会
協賛：(社)繊維学会ほか
日時：平成19年7月26日(木)～27日(金)
場所：神戸国際会議場(神戸市中央区港島中町6-9-1)

<http://www.kcva.or.jp/kcc/icck/>

詳細は、下記にお問い合わせ下さい。

〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31
産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門バイオ
ベースポリマーグループ(相羽誠一)
TEL: 072-751-9522 FAX: 072-751-9628
E-mail: chitin@m.aist.go.jp <http://www.jscs.jp/>

第55回レオロジー討論会

主催：日本レオロジー学会、日本バイオレオロジー学会
共催：金沢大学、日本材料学会、プラスチック成形加工学会

協賛：(社)繊維学会ほか

日時：平成19年11月1日(木)～3日(土)

場所：金沢大学角間キャンパス南地区 自然科学本館
(〒920-1192 金沢市角間町)

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/university/access/images/kakumal.pdf>

講演申込締切：平成19年8月10日(金)

要旨集原稿提出締切：平成19年10月1日(月)

詳細は、下記にお問い合わせ下さい。

〒600-8815 京都市下京区中堂寺粟田町93番地
京都リサーチパーク内 (社)日本レオロジー学会
TEL: 075-315-8687 FAX: 075-315-8688
E-mail: member@srj.or.jp

Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation

Toshia Fujisato¹, Seiichi Funamoto², Ken'ichi Yoshida³, Tetsuji Yamaoka¹, Tsuyoshi Kimura², Masahiro Kikuchi⁴, Yasuhiko Kobayashi⁴, Akio Kishida² and Takeshi Nakatani¹

¹National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

²Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

³Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan

⁴Takasaki Advanced Radiation Research Institute, Japan Atomic Energy Agency, Takasaki, Japan

Statement of Purpose: The reconstruction of heart valves using acellular xenogeneic scaffolds has been studied to have more durability with growth potential applicable to pediatric patients. Most of the groups developing acellular scaffolds have been using detergents and/or enzymes as decellularization media such as Triton® X-100, sodium dodecyl sulfate, deoxy-cholate, trypsin, DNase, and RNase. Since the detergents are generally cytotoxic and it takes time for their removal before the transplantation, it may lead denature of biological properties and contamination in the process. We have been developing several tissue processes for preparation of acellular grafts using ultrahigh pressure, microwave irradiation, and supercritical fluid extraction. In this paper, a novel process using γ -ray irradiation has been reported. All of these processes do not include any detergent and may be applicable to relatively large tissues.

Methods: Mouse, rat, and porcine vascular tissues were isolated and irradiated by the γ -ray of 10, 30, 100, 300, and 1000 Gy in PBS at room temperature. The dosage rates were 100, 300, 100, 300, and 1000 Gy/hr, respectively. They were then rinsed by PBS-based washing solution including DNase and RNase at 4 °C for 1 week. The tissues treated were subjected to histological study, residual DNA assay, and biomechanical study by the tensile strength measurement.

The acellular porcine aortas were implanted in subcutaneous space of Wister rats. The grafts were explanted and examined histologically after 2 weeks of implantation. All animals were carefully reared in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised in 1985).

Results / Discussion

There were no cells observed in the tissues pretreated by the γ -ray more than 300 Gy (Fig.1). The amount of DNA in the tissue was lower than 10% of that in the native tissue (Fig.2). There were no significant changes in biomechanical properties of breaking strength and elastic modulus in the acellular tissues.

There were mild tissue responses of T-cells and macrophages observed in the acellular tissue prepared by γ -ray irradiation of 1000 Gy whereas severe responses observed in the control tissue 2 weeks after the implantation to rat subcutaneous space (Fig.3).

Conclusions:

This process may have more secure acellular scaffolds for the tissue regeneration.

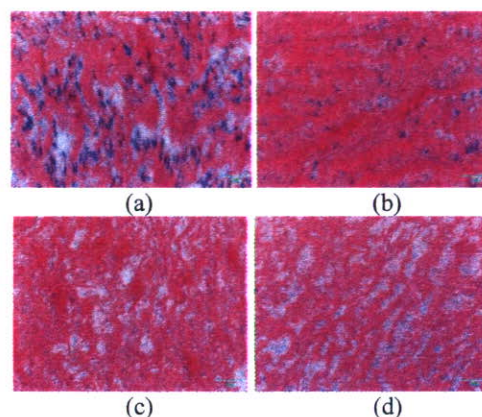


Fig.1 The (a) native and γ -ray pretreated porcine aortas of (b) 30, (c) 300, and (d) 1000 Gy followed by washing.

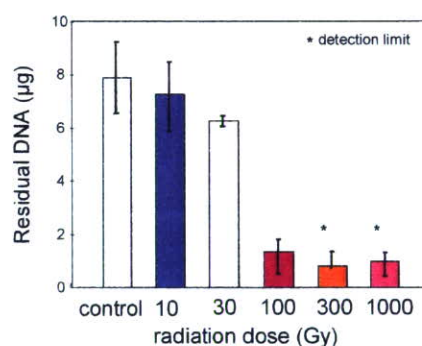


Fig.2 The amount of residual DNA in the treated aorta.

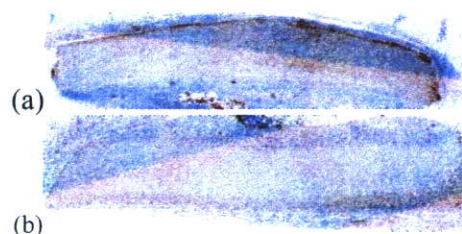


Fig.3 Anti-CD68 (macrophage) staining of (a) native and (b) acellular porcine tissues 2 weeks after implantation to rat subcutaneous space.

Acknowledgements: This study was supported by the Research Grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

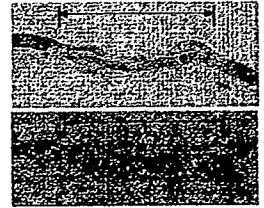
PS2-4-5

生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発

寺田堂彦^{1,2}・澤田和也³・緒方裕之²・平工香織²・鎌田和加子²・吉田謙一⁴・船本誠一²・永谷憲歳²・岸田晶夫⁵・藤里俊哉²・中谷武嗣²

(1.医療機器センター・2.国立循環器病センター・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)

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、細胞の足場となるスキヤフォールドが必要不可欠である。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を開発している。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について検討した。ミニブタ大動脈から架橋および酵素処理によって作成したバイオスキヤフォールドを同種同所性に移植し、自己組織化および石灰化を評価した。移植後3ヶ月には、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。



ミニブタ下行大動脈置換移植3ヶ月後のスキヤフォールド断面組織染色写真
上) α -SMA 免疫染色 下) kossa 染色

オリゴ乳酸-ペプチドコンジュゲートを用いた ポリ乳酸スキャホールドの表面修飾

¹国循セ研、²京工織大院工芸科学、

○内田翔^{1,2}、藤里俊哉¹、小堀哲生²、村上章²、山岡哲二¹

〔緒言〕 生体吸収性かつ非毒性であるポリ乳酸系スキャホールドの細胞親和性を改善するためには、フィブロネクチン由来の細胞接着性 RGD ペプチドによる表面修飾が有効である。しかしながら、反応性の高い側鎖官能基をもたないポリ乳酸の表面修飾は困難である。本研究では、RGD 配列を含むオリゴペプチドの N 末端にオリゴ-L-乳酸(OLLA)が結合したコンジュゲートを用いた新たなスキャホールドの表面修飾法を開発した。この両親媒性コンジュゲートとポリ乳酸の混合溶液からフィルムや多孔質体を成形すると、オリゴ乳酸セグメントとポリ乳酸との親和性により、コンジュゲートの溶出が抑制された、細胞接着性表面が形成されると期待される。

〔実験〕 減圧脱水重縮合によって合成したオリゴ-L-乳酸(OLLA)を無水酢酸と反応し、OH 末端アセチル化オリゴ-L-乳酸(acOLLA)を合成した。その後、Fmoc 固相合成法で合成したオリゴペプチドに固相担体上でオリゴ-L-乳酸をカップリングした。得られたオリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドコンジュゲート(acOLLA-RGD)をポリ-L-乳酸溶液に添加した。この混合溶液を用いて、スピコート法によりフィルムを作製した。作製したフィルムに NIH/3T3 細胞を 5×10^4 cells/cm² 播種し、3 時間後の接着細胞数を定量した。

〔結果・考察〕 オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドコンジュゲートを添加したフィルムでは、添加していないフィルムに比べ接触角が低下した。また、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドコンジュゲートを添加したフィルムでは、添加していないフィルムに比べ細胞の接着数が 34%向上した (図 1)。これらの結果より、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドコンジュゲートはポリ乳酸スキャホールドの表面修飾分子として有用であることが示唆された。

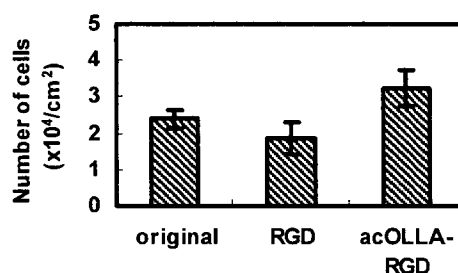


Figure 1. NIH/3T3 cell adhesion on original and acOLLA-RGD(2wt%/PLLA)-modified PLLA films. Cells were seeded at 5×10^4 cells/cm² and cultured for 3h at 37°C under 5% CO₂ (serum free medium). All values are mean \pm SD (n=3).

Surface modification of PLLA scaffolds using oligo(lactic acid)-peptide conjugates

Sho UCHIDA^{1,2}, Toshiya FUJISATO¹, Akio KOBORI², Akira MURAKAMI², and Tetsuji YAMAOKA¹

(¹National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, JAPAN and

²Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, JAPAN)

¹Tel:+81-6-6833-5012, Fax:+81-6-6833-5476, E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp

Keyword: Poly(lactic acid) / scaffold / surface modification

Abstract: PLLA is widely studied as scaffolds due to its biodegradability and low toxicity, but the adhesion and proliferation of cells on PLLA surface are insufficient. Since surface modification of PLLA which do not possess any functional groups is quite difficult, we developed a novel method for its surface modification using functional peptides. Oligo(lactic acid) was conjugated to the functional peptides to stabilize the peptide on/in the PLLA scaffold. The oligo(lactic acid)-peptide conjugates were added to the PLLA solution, and the solutions were spin coated to prepare the surface-functionalized film. Cells were seeded on the surface-modified film, and their behaviors were evaluated.

Development of vascular grafts having an in situ repopulation ability

Dohiko Terada^{1,2}, Kazuya Sawada³, Hiroyuki Ogata², Kaori Hiraku², Wakako kamata², Ken'ichi Yoshida⁴, Seiichi Funamoto², Noritoshi Nagaya², Akio Kishida⁵, Toshia Fujisato², Takeshi Nakatani²

¹Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, Tokyo, Japan,

²National Cardiovascular Center, Osaka, Japan, ³Osaka Seikei College, Osaka, Japan,

⁴Foundation for Biomedical Research and Innovation, Hyogo, Japan, ⁵Tokyo Medical Dental University, Tokyo, Japan

Introduction

Although an artificial blood vessel is in general use, the development of regenerative vascular grafts is strongly desired especially for the pediatric patients. To reconstruct the tissues mainly composed of extra cellular matrix such as arterial tissues or heart valves, an appropriate structural matrix as the scaffold for cell growth is needed [1]. There are many research works related to artificial grafts made of biodegradable synthetic materials. However, it is still difficult to control the biodegradability due to their hydrolysis, adapt the mechanical properties required in the artery, and reproduce complex shape such as an aortic arch. In this study, regenerative collagenic vascular grafts were developed from porcine aorta by removing cells and structural proteins except collagen from the tissue. They were transplanted to miniature pigs and in situ repopulation was studied.

Materials and Methods

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 including CaCl₂ of 10 mM and NaN₃ of 0.02% 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. After 3 months of the implantation, the grafts were explanted and examined histologically.

Results and Discussion

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 component inside (Fig. 1). The collagen fibers remaining in the tissue were also degraded completely by collagenase and it means that the biodegradability of the tissue was not affected by



Fig.1 Histological staining of the cross-section of vascular grafts. Left, H.E. staining; Right, EVG staining. The bars in the pictures are corresponding to 200 µm.

the cross-linking treatment. Biodegradability is one of the most important property as a regenerative graft. The tensile strength certainly decreased after the enzymatic treatment, however an appropriate cross-linking could reduce the decline in tensile strength. The graft may be applicable not only to the pulmonary artery but to the other arteries. There was no thrombus on the intimal surface and aneurysm formation even after 3 months of the implantation (Fig. 2).

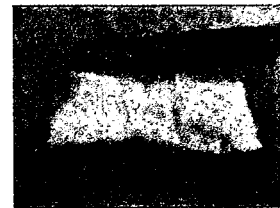


Fig.2 The intimal surface of the explanted graft. Implantation period was 3M. Scaffold part is shown in the figure.

A large amount of the cell migration into the graft was observed (Fig. 3). 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.



Fig.3 H.E. staining of the cross-section of the explanted graft. Implantation period was 3M. The bar in the figure is corresponding to 200 µm.

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

References

1. D.T.Simionescu, Q.Lu, Y.Song, J.S.Lee, T.N.Rosenbalm, C.Kelly, N.R.Vyavahare, Biomaterials, 27, 702-713, 2006.

P97. Regenerative Vascular Graft For Aortic Root Reconstruction In Porcine Model

Toshia . Fujisato¹; Dohiko . Terada¹; * Kazuo . Niwaya¹; Kenji . Minatoya¹; Akio . Kishida²; * Takeshi . Nakatani¹; * Soichiro . Kitamura¹

¹National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; ²Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda, Tokyo, Japan

OBJECTIVES: Tissue-engineered grafts may have the advantage of growth potential and anti-infection compared with current artificial devices. Biodegradable materials such as polylactide and/or polyglycolide are commonly used for the scaffolds. However, since they are degraded by a simple hydrolysis, it is not easy to have enough mechanical strength in the aortic tissue. Regenerative grafts made of collagenous tissue have been developed by an elimination of elastin and cellular components from porcine aortas.

METHODS: Porcine aortas were cross-linked in a vacuum oven followed by elastase digestion. They were implanted at descending aorta through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 4, 12, and 24 weeks after the implantation and examined histologically and immunohistologically.

RESULTS: There were no cells and elastin fibers observed in the tissues treated. The amounts of DNA and phospholipids were lower than 5% of the native. The breaking strength was lower than that of the native aorta but higher than of the native pulmonary artery. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by smooth muscle cells and fibroblasts after 12 weeks. There was no calcium deposits observed in the graft.

CONCLUSIONS: The residual phospholipids and denatured elastin fibers may cause the calcification after the graft implantation. This process eliminates these substances and may be useful for having regenerative scaffolds for the vascular tissue regeneration.

3D12

移植用生体弁の力学評価

大阪工業大学 ○寺田堂彦、藤里俊哉

緒言

我が国では、現在年間1万件（機械弁，70%；異種生体弁，30%；同種生体弁，<1%）を越える心臓弁置換術が行われているが、いずれの置換弁も、不全弁の機能を代行することのみを目的としているため、患者の体内では永久的に異物として存在し続ける。また、置換弁には患者の成長に合わせた成長能が備わっていないため、小児患者への適応には問題が残る。近年、これらの問題を解決するために、組織工学的手法を用いた再生型移植用生体弁の研究が盛んに行われている。患者自身の自己弁組織を再構築し、その機能を回復させることを目的としており、再生弁組織には成長性の獲得も期待されている。一般的には、脱細胞化したブタ弁組織、あるいはポリマー製人工弁組織を用いた様々な研究が行われている。しかしながら、再生型移植弁に関する材料規格や試験方法は各研究室間で統一されておらず、臨床応用へ向けた規格の策定や、標準化された材料試験方法の確立が必要となってくる。そこで本研究では、ネイティブブタ弁組織や、再生型移植弁の開発を目的として作製された脱細胞化ブタ弁組織の力学評価を基に、材料試験法の標準化のための基礎的な知見を報告する。

実験

試料準備

屠殺直後（㈱ジャパンファーム）に採取した食用ブタの心臓を、保冷下で輸送し、解体して大動脈弁組織を分離した。生理食塩水で洗浄した後、試験実施までの間、4℃のPBS（5%ペニシリンストレプトマイシン含有）中で保存した。試験実施直前に弁尖を基底部から切除し、引張り試験片形状に切り出して試験に供した。

引張試験

各弁尖の円周方向および半径方向に対して引張試験（オリエンテック万能試験機）を行った（図1参照）。試験片幅は3mm、クロスヘッドスピードは20mm/min、チャック圧は150g/mm²とし、試験片-チャック間には、滑り防止のために耐水ペーパーを使用した。断面積は、試験片長さ、幅および比重より算出し、図2中の応力は、真応力を示している。

結果と考察

図2に、円周方向と半径方向の代表的な応力歪み曲線を示した。図のように、円周方向と半径方向とで大きな異方性が存在していることがわかる。この異方性は、図1に見られるように太いコラーゲン線維が円周方向に多く配向しているのに対し、半径方向には連続した線維が見られないことに起因している。この異方性は、大動脈弁の3尖弁（右冠尖、左冠尖、無冠尖）のいずれにも同様に認められ、弁尖の力学特性を評価する上で試験方向の重要性を示唆する結果である。また、3尖弁間の比較においてもその引張り挙動に差が認められた。これは、バルサルバ洞に右冠上動脈と左冠状動脈が存在し、それぞれの弁尖に対する血流負荷が異なることに起因すると考えられる。すなわち、移植用生体弁を評価する上で、いずれの弁尖を対象とするかも考慮しなければならない要素の1つである。なお、この研究は科学技術振興調整費によって行われたものである。

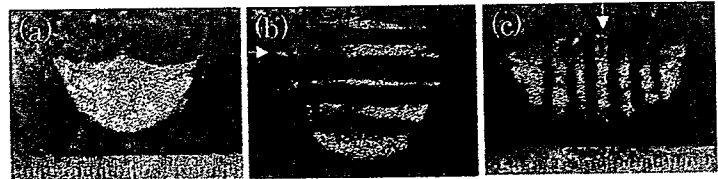


Fig.1 (a) appearance of aortic valve leaflet and (b) circumferential and (c) radial strips for tensile test. Arrows in the figure point specimens of each tensile directions.

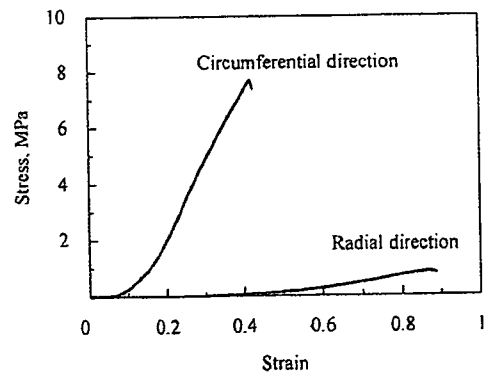


Fig.2 Stress-strain curves of valvular strip in circumferential and radial direction.

2P-60 放射線照射による脱細胞バイオスキャホールドの調製

大阪工業大学：藤里俊哉

原子力機構・量子ビーム：菊地正博、坂下哲哉、舟山知夫、小林泰彦

東京医科歯科大・生体材料工学研：船本誠一、木村剛、岸田晶夫

国立循環器病センター研究所：山岡哲二

1. はじめに

現在、我が国において人工心臓弁は年間1万個、人工血管は5万本が使用されている。屍体から提供されるヒト心臓弁や血管も組織バンクを通じて臨床使用されているが、年間数十件程度に過ぎない。米国では商業利用によって、年間数千件のヒト組織が使用されている。人工素材から作製される移植用組織は生体にとっては異物であり、自己組織と置き換わることはない。また、小児患者においては体の生育に伴った成長性が欠如しているという欠点もある。近年、移植後の拒絶反応を避けるために、自己組織と置換される素材を用いた組織再建が臨床応用され始め、東京女子医大グループによる生体内分解吸収性材料を用いた再生型血管や、ドイツ・フンボルト大学グループによるブタ脱細胞化組織を用いた再生型心臓弁が報告されている。我々は、放射線照射によって細胞を除去した生体組織をバイオスキャホールド（細胞足場材料）として用いた再生型移植用組織の開発を行っている。

2. 実験方法

細胞の除去処理：生後4ヶ月、体重約10kgのクラウン系ミニブタ（㈱ジャパンファーム、鹿児島）から清潔下にて下行大動脈を採取した。PBSによる洗浄後、PBSを満たした滅菌容器に封入し、10, 30, 100, 300, あるいは1000 Gyのガンマ線を高崎量子応用研究所のCo-60照射施設を用いて照射した。吸収線量率は、それぞれ100, 300, 100, 300, 1000 Gy/hである。照射後、PBSをベースとする洗浄液にて2週間洗浄した。洗浄液は、適宜交換した。

皮下埋入試験：Wisterラット（7週令）の皮下部位に上記脱細胞化ミニブタ大動脈を埋入し、2週間後に取り出し、ヘマトキシリン-エオジン（HE）染色、マクロファージに対するCD68免疫染色にて組織学的検討を行った。

3. 結果及び考察

種々のガンマ線量による組織脱細胞化の基礎的検討を残存DNA定量試験、力学試験にて行った。その結果、残存DNA定量試験では、100あるいは300 Gy以上の照射では大幅なDNA減少傾向が見られた。また、力学特性は、破断強度並びに

弾性率とも大きな影響は見られなかった。すなわち、300 Gy以上のガンマ線を照射後、洗浄処理することによって、循環器系組織内の細胞はほぼ完全に除去できると思われた。

次に、ガンマ線照射によって作製した脱細胞化ミニブタ大動脈の有効性を、ラット皮下への埋入試験により、組織学的、免疫組織学的検討を行った。図1には、マクロ観察及びHE染色の結果を示した。ガンマ線未照射ミニブタ大動脈の場合、ラット由来の血管の流入が認められた。一方、1000 Gyのガンマ線照射脱細胞化ミニブタ大動脈では、血管の流入は確認されなかった。HE組織染色結果からは、ガンマ線未照射ミニブタ大動脈では、組織反応による細胞の浸潤が見られたが、1000 Gyのガンマ線照射脱細胞化ミニブタ大動脈では、細胞の浸潤は認められなかった。



未照射



1000Gy

図1 脱細胞化ブタ血管組織のラット皮下埋入（2週間、左：マクロ、右：HE）

また、移植片を免疫染色によって評価した結果、未処理血管では、マクロファージ陽性を示すCD68陽性部位が多く見られるのに対して、ガンマ線照射脱細胞化血管では、炎症部位の減少が示された。これら染色画像について画像解析ソフトを用いてCD68陽性細胞面積を計測した。その結果、未処理血管では、炎症細胞が多く存在していたが、ガンマ線照射の組織では炎症細胞が有意に減少していた。

P-1

超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価

○船本誠一^{1) 2)}、橋本良秀^{1) 2)}、佐々木秀次^{2) 3)}、南 祐広¹⁾、望月 学³⁾、
藤里俊哉⁴⁾、木村 剛^{1) 2)}、小林尚俊^{1) 2)}、岸田晶夫¹⁾

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所²⁾ 物質・材料研究機構 生体材料センター、
3) 東京医科歯科大学 医学部附属病院 眼科、4) 大阪工業大学大学院 生体医工学セン
ター

【はじめに】

人工角膜として、これまでに多くの材料研究が行われているが、移植後の感染や脱落により、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として、組織の脱細胞化が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高压印加により組織内の細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高压脱細胞化法を考案した。本手法で、細胞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人工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、他の脱細胞法である界面活性剤を用いた脱細胞化角膜の調製についても比較検討した。

【実験方法】

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。超高压印加装置を用い、10℃と30℃にて4,000~10,000気圧の超高压印加を10分間行った。続いて3日間の洗浄を行い、細胞残渣を除去した。得られた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。

【結果と考察】

超高压処理による脱細胞化をHE染色で評価した。完全な細胞除去が達成され、またコラーゲン線維の配向も維持されていた。しかし、圧力の上昇に伴う透明性の低下と力学特性に変化が見られた。また、洗浄中での浸透圧変化による組織の膨潤が認められた。そこで、脱細胞角膜を高張液であるグリセロールにて浸漬した結果、組織の透明性は回復した。*in vivo*実験においては、移植直後の脱細胞化移植片は白濁しているが、4週間経過後で移植組織片は透明になり、8週間後でも透明性を保っていた。これらのことより、人工角膜としての可能性が示唆された。

1112 再生型心臓弁の特性評価

Characterization of Regenerative Heart Valve.

- 寺田堂彦 (大阪工業大学) 藤里俊哉 (大阪工業大学)
中谷武嗣 (国立循環器病センター) 北村惣一郎 (国立循環器病センター)

Dohiko TERADA, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka city, Osaka.
Toshiya FUJISATO, Osaka Institute of Technology
Takeshi, NAGAYA, National Cardiovascular Center
Souichiro KITAMURA, National Cardiovascular Center

The purpose in this study is to characterize a regenerative heart valve mechanically which was developed from a porcine aortic valve with our ultra-high pressure method. The result of tensile test on a porcine native valve showed anisotropy in a leaflet. A maximum stress on a circumferential direction was much greater than that on a radial direction. This difference of maximum stress in each direction may depend on orientation of collagen fibers. The tensile property of a human valvular leaflet was similar to the property of a porcine valve. A maximum stress of the regenerative valvular leaflet was considerably stronger than that of the porcine and the human native leaflet. The thickness of the regenerative valvular leaflet decreased because glycosaminoglycan and other contents were removed from the inside through the decellularization process. Consequently the maximum stress increased although maximum load of the regenerative leaflet was not so different from the native one. This result means that the property of collagen was not affected by our decellularization treatment. The results of this study showed that the regenerative valve could be implanted to a human from the point of tensile property.

Key words; heart valve, tensile test, regenerative medicine.

[緒言]

我が国では、現在年間1万件(機械弁, 70%; 異種生体弁, 30%; 同種生体弁, <1%)を越える心臓弁置換術が行われているが、いずれの置換弁も、不全弁の機能を代行することのみを目的としているため、患者の体内では永久的に異物として存在し続ける。また、置換弁には患者の成長に合わせた成長能が備わっていないため、小児患者への適応には問題が残る。

近年、これらの問題を解決するために、組織工学的手法を用いた再生型移植用生体弁の研究が盛んに行われている。患者自身の自己弁組織を再構築し、その機能を回復させることを目的としており、再生弁組織には成長性の獲得も期待されている。一般的には、脱細胞化したブタ弁組織、あるいはポリマー製人工弁組織を用いた様々な研究が行われている。しかしながら、再生型移植弁に関する材料規格や試験方法は各研究室間で統一されておらず、臨床応用へ向けた規格の策定や、標準化された材料試験方法の確立が必要となってくる。そこで本研究では、再生型移植弁の開発を目的として作製された脱細胞化ブタ弁組織の力学評価を行い、材料試験法の標準化のための基礎的な知見を報告する。

[実験]

試料

ブタ心臓弁 屠殺直後(㈱ジャパンファーム)に採取した食用ブタの心臓を、保冷下で輸送し、解体して大動脈弁組織を分離した。生理食塩水で洗浄した後、試験実施までの間、4℃のPBS(5%ペニシリンストレプトマイシン含有)中で保存した。

再生型心臓弁 ブタ心臓弁に対して、10℃のPBS中で980MPa(10,000atm)の圧力を10分間印加した後、PBSをベースとした洗浄液中で14日間、振盪洗浄した。その後、80%エタノール/PBS中で3日間振盪し、さらにPBSで置換した後、試験に供した。

ヒト心臓弁 国立循環器病センター組織保存バンクより、凍結保存された移植用ヒト心臓弁組織の提供を受けた。このヒト組織は、細菌感染検査などの各種検査結果から、ヒトへの移植には不適とされたもので、研究への提供に同意されたものである。組織保存バンクより凍結状態で輸送された組織は、臨床で使用される場合と同じ手順で解凍され、試験に供した。

試料準備

試験実施直前に弁尖を基底部から切除し、引張り試験片形状に切り出して試験に供した。間隔3mmとなるように並行に固定した2枚の剃刀刃を用いて、弁尖から各試験方向の引張り試験片を切り出した。デジタルマイクロメータを用いて試験片の長、短軸方向の長さを測定した後、試料表面の水分を濾紙で拭き、重量と比重を測定して断面積を算出した。

引張試験

各弁尖の円周方向および半径方向に対して引張試験(オリエンテック万能試験機)を行った(図1, 2)。試験片幅は3mm、クロスヘッドスピードは20mm/min、チャック圧は150g/mm²とし、試験片・チャック間には、滑り防止のために耐水ペーパーを使用した。

[結果と考察]

図3に、ネイティブブタ心臓弁の円周方向と半径方向における代表的な応力歪み曲線を示した。図のように、円周方向と半径方向とで大きな異方性が存在していることがわかる。図4には、円周方向断面と半径方向断面のエラスチカ・ワン・ギーソン (EVG) 染色写真を示した。図のように、円周方向には配向したコラーゲン線維が多く見られるのに対して、半径方向には連続した線維が見られず、このことが応力歪み曲

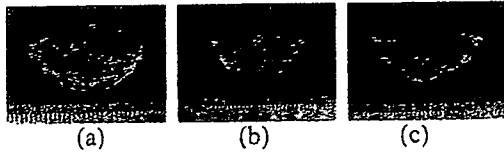


Fig. 1 Appearance of native porcine aortic valve. (a), right coronary cusp (RCC); (b), non coronary cusp (NCC); (c), left coronary cusp (LCC).



Fig. 2 Valvular strips for tensile test in each direction. (a), circumference; (b), radial direction. Arrow in the figure points a tensile specimen.

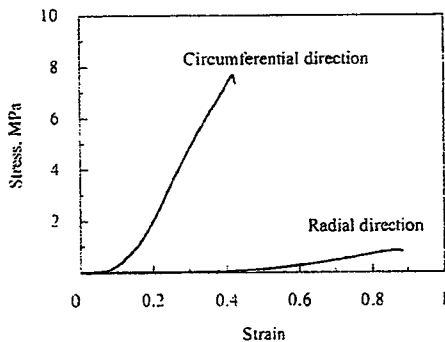


Fig. 3 Stress-strain curves of valvular strip in circumferential and radial direction.

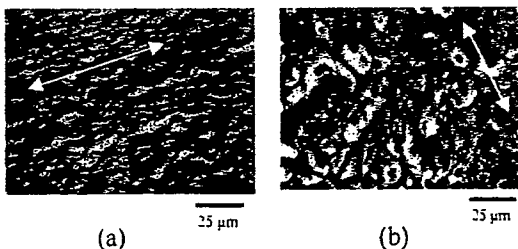


Fig. 4 Elastica van Gieson staining of a cross-section on (a) circumferential and (b) radial directions of a native porcine valvular leaflet. Arrow in the figure shows each direction.

線に顕著な異方性として現われたものと考えられる。この異方性は、大動脈弁の3尖弁(右冠尖、左冠尖、無冠尖)のいずれにも同様に認められ、弁尖の力学特性を評価する上で試験方向の重要性を示唆する結果である。

図5に、ネイティブヒト心臓弁とネイティブブタ心臓弁の、円周方向における応力歪み曲線を示した。図のように、ヒト弁尖の破断応力はブタ弁尖のそれよりも若干低い。生体組織の力学特性を評価する際、個体差の影響を無視することは出来ず、また、同一個体であっても年齢によって組織の物性は変化するため、さらに試料数を増やして検討する必要がある。

図6に、再生型心臓弁とネイティブブタ心臓弁の円周方向

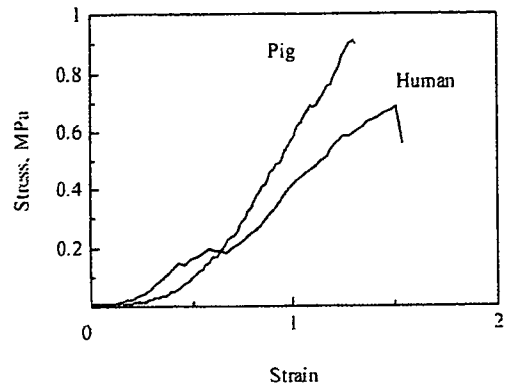


Fig. 5 Stress-strain curve of a human and a porcine valve leaflet. Tensile direction is parallel to circumferential direction of a valve leaflet.

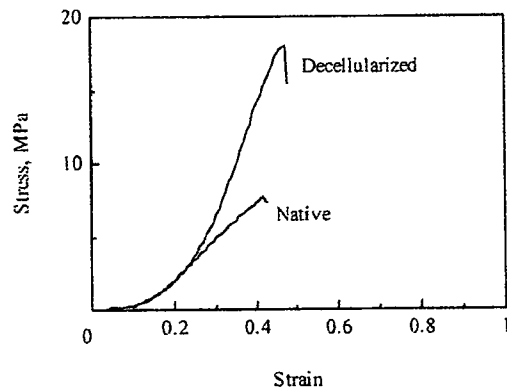


Fig. 6 Stress-strain curves of a decellularized and a native porcine valve leaflet. Tensile direction is parallel to radial direction of a valve leaflet.

における応力ひずみ曲線を示した。図のように、再生型心臓弁の破断応力は、ネイティブの結果と比較して大幅に上昇していることがわかる。しかしながら、破断荷重で比較した場合、ネイティブ心臓弁と再生型心臓弁はほぼ同等の値を示していたことから、破断応力の差は脱細胞化処理による弁尖の厚さの減少を意味している。超高静水圧印加処理とその後の洗浄処理過程において、グリコサミノグリカンなど保水性成分が喪失したものと推察される。しかしながら、先述のように破断荷重に顕著な差は認められず、弁尖の強度に寄与するコラーゲン線維は脱細胞化処理後も保存されていると考えられる。

今回の引張り試験の結果からは、我々の開発した再生型心臓弁は移植に耐える強度を有していると判断出来る。再生型心臓弁を臨床試験へ進めるため、さらに疲労耐久試験など他の試験も検討中である。

SY8-5 Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds Prepared by Detergent-Free Treatment

¹⁾Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan, ²⁾National Cardiovascular Center, Osaka, Japan, ³⁾Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Toshia Fujisato¹⁾, Dohiko Terada¹⁾, Kazuo Niwaya²⁾, Kenji Minatoya²⁾, Akio Kishida³⁾, Takeshi Nakatan²⁾, Soichiro Kitamura²⁾

OBJECTIVES

Tissue-engineered grafts based on acellular matrices have been studied to give more durability with growth potential and less immunogenicity to the current bioprostheses. Detergents are commonly used for removal of the cells, whereas they are generally cytotoxic and may prevent repopulation after the transplantation.

METHODS

Porcine tissues of the heart valves and aortae were isolated under the sterile condition. They were treated immediately by cold isostatic pressing (CIP) of 980 MPa followed by washing at 4°C for decellularization. This does not include any processes using detergents. The acellular scaffolds were transplanted to orthotopic positions of miniature pigs. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 3, 6 or 12 months after the transplantation and examined histologically and immunohistologically.

RESULTS

The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by cells from both sides of endothelium and outer tissue after 3 months. It was dominant in the latter. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells after 6 months, mainly by smooth muscle cells. The grafts followed the growth of their hosts after 12 months.

CONCLUSIONS

The acellular scaffolds prepared by detergent-free treatment may have a potential for remarkable repopulation after their transplantation.

Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration

T. Fujisato¹, D. Terada¹, K. Sawada², K. Yoshida³, A. Kishida⁴, K. Minatoya³, K. Niwaya³, T. Nakatani³, and S. Kitamura³

¹Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

²Osaka Seikei College, Osaka, Japan

³National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

⁴Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Introduction

The artificial heart valve is one of the most successful implantable medical devices. The xenograft valves made of the chemically crosslinked porcine valve or bovine pericardium have good biocompatibility, hemodynamics, and resistant to infections compared with the mechanical valves. However, the durability of the xenograft valve is relatively short in about 15 to 20 years in elderly and 5 to 10 years in pediatric patients by the calcification of the fixed tissue. The regeneration of heart valves using acellular xenogeneic scaffolds has been studied to have more durability with growth potential. It is very important to evaluate acellular xenogeneic scaffolds before clinical application to avoid severe failures such as transfer of unknown animal related infectious diseases. Our tissue processing for decellularization by ultrahigh pressure treatment for the safe valvular tissue regeneration was reported.

Materials and Methods

Porcine heart valves were isolated under the sterile condition from the Claw miniature pigs (Japan Farm Co., Ltd.). They are then decellularized by our PowerGraft technology. Briefly, the tissues were treated by a cold isostatic pressing (CIP, Kobe Steel Co., Ltd.) of 980 MPa (10,000 atm) at 4°C for demolition of the cells inside followed by rinsing in PBS-based washing solution and ethanol solution at 4°C for 2 weeks with gentle stirring. The tissues treated were subjected to histological study, detection of residual DNA, phospholipids, alpha-galactose, and porcine endogenous retrovirus (PERV), and biomechanical study. The acellular scaffolds were transplanted into the allogeneic miniature pigs. The aortic root was implanted at descending aorta through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. They were explanted 3, 6, and 12 months after the transplantation and examined histologically. All animals were carefully reared in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised in 1985).

Results and Discussion

The tissues were cell free in the HE stained sections by the PowerGraft technology. The amounts of DNA and phospholipids in the tissue treated were almost 0 and about 5% of that in the native tissue, respectively. There was no alpha-galactose (Fig. 1) and PERV detected from the acellular tissue by the immunostaining and PCR assay, respectively. It has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP more than 600 MPa. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus.

The animals survived after the transplantation in all cases. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis. The inner surface was smooth and had no thrombus formation. From the immunohistological observation, infiltrations of smooth muscle cells and fibroblasts were identified in all areas of the grafts at 6 months. The luminal surfaces were completely covered with endothelial cells. Calcium deposits were observed slightly. The sizes of the grafts after 12 months of transplantation were about 1.5 times of those at transplantation.

Conclusions

Porcine cells were removed from the tissue without changing its biomechanical property in a short time by the PowerGraft technology. There was no DNA, alpha-galactose, and PERV detected in the porcine acellular tissues and this indicates the tissues are very safe even for the xenogeneic transplantation. The results in porcine model were encouraging to have durable and safe acellular scaffolds for the valvular tissue regeneration.

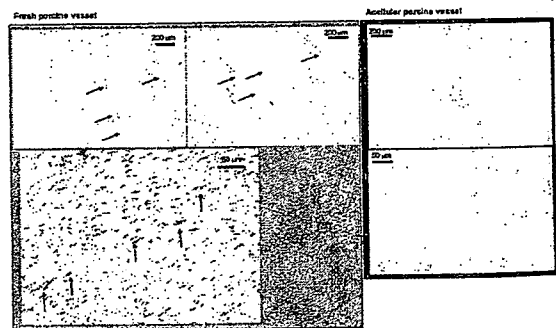


Fig. 1 Immunostaining of anti-alpha-galactose in the native (left) and acellular (right) tissues.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and the Japan Health Sciences Foundation.

TISSUE REGENERATION BY DECELLULATIZED BIOLOGICAL SCAFFOLDS PREPARED BY DETERGENT-FREE TREATMENT

Fujisato T¹, Terada D¹, Funamoto S², Minatoya K³, Kishida A², Yamaoka T³, Nakatani T³, Kitamura S³

¹ Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

² Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

³ National Cardiovascular Center, Osaka, Japan

INTRODUCTORY REMARKS: Decellularized tissues and those recellularization are widely studied to give more durability with potential growth and invisible immunogenicity to the conventional bioprostheses like glutaraldehyde-treated heart valves. Detergents are commonly used for removal of the cells, whereas they are generally cytotoxic and may prevent repopulation after the transplantation. We are investigating efficient processes of decellularization and recellularization of biological tissues to have bioscaffolds with excellent repopulationability after their implantation.

MATERIALS AND METHODS: Porcine pulmonary valves, aortas, connective tissues and other tissues were excised and treated by an ultra-high pressure treatment of 980 MPa at the room temperature. They were then washed with buffer and alcohol with gentle stirring. No detergents were used in the processes. The acellular scaffolds of heart valves and aortas were transplanted to orthotopic positions of miniature pigs. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 3, 6 or 12 months after the transplantation and examined histologically and immunohistologically.

RESULTS: The leaflet, aorta, and some connective tissues were completely cell free after the treatment. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus of the leaflets treated. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by cells from both sides of endothelium and outer tissue after 3 months. It was dominant in the latter. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells after 6 months, mainly by smooth muscle cells. The grafts followed the growth of their hosts after 12 months.

DISCUSSIONS: The acellular scaffolds prepared by detergent-free treatment may have a potential for remarkable repopulation after their transplantation.

PRESENTED BY:

Professor Toshia Fujisato
Biomedical Engineering
Osaka Institute of Technology
5-16-1 Omiya, Asahi
Osaka, Japan, 5358585

Phone: 81-6-6954-4746
Email: fujisato@bme.oit.ac.jp

他人の頭皮で髪復活

細胞洗い流し、「抜け殻」移植

美容外科手術などであまった他人の健全な頭皮で毛の生えやすい基盤をつくり、髪の毛が少ない人の頭髪をよみがえらせる再生医療の研究を、国立循環器病センター（大阪府吹田市）、神戸大学病院、大阪工業大のグループが始める。まず人の頭皮を利用した基盤づくりの共同研究をする。国循環センターの倫理委員会が31日研究を承認した。

（林義則）

国循環センターなど研究開始

他人の細胞は拒絶反応を引き起こす。拒絶反応を避けるため、国循環センターがプタの心臓弁の再生で成功した脱細胞化処理法を用いる。これは、薬品を使わずに高い水圧をかけて組織の中にある細胞を壊し、洗い流して

組織の「抜け殻」を移植するもの。新たにできる組織や臓器には患者自身の細胞が入り込み、拒絶反応を起こさないという。研究は、他人の頭皮をとりだし、1万気圧の水圧を約15分間かけて細胞を壊し、除去する。残った

たコラーゲンなどによる1センチ四方の基盤の性質を確認する。その後、臨床研究を検討し、基盤の上に毛根を包んでいる患者の毛包をつけ、患者に移植。毛根づくりの指令を出す、毛乳頭細胞を患者からとりだして新たな頭皮に育った基盤に注射し、頭髪の再生を促す。

The Asahi Shimbun

毛髪の生える新しい頭皮づくりの仕組み

① 他人から健全な頭皮を取り出す

② 細胞を取り除く

③ 本人の毛包をつけると表皮もできる

④ 移植する

⑤ 本人の毛乳頭細胞を埋め込む

表皮
真皮
皮下組織

毛根周辺の構造

コラーゲンなど細胞

毛包

表皮

移植

培養した毛乳頭細胞

皮脂腺

立毛筋

毛包

毛乳頭細胞

毛細血管