

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¹, 山崎健一¹, 小林裕之¹, 宇戸禎仁¹, 江橋具², 近藤英雄¹, 橋本成広¹, 藤里俊哉¹

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 HAYASHI¹, Kenichi YAMASAKI¹, Hiroyuki KOBAYASHI¹, Sadahito UTO¹, Tomo EHASHI², Hideo KONDO¹, Shigehiro HASHIMOTO¹, Toshia FUJISATO¹

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^{1,2)}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, 1.0×10^4 cells/cm² の密度で 60 mm コラーゲンコートディッシュ (Dish) と Type-I コラーゲング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, CO₂ 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_{pp} から 45V_{pp} 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。

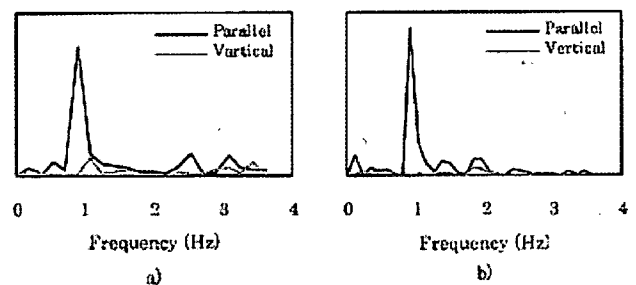


Fig. 1 Spectrum of C2C12 contraction by electric pulse. a) Dish, b) Gel

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増加したことは, 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

および 5 Hz では電気パルスに同期する細胞も見られたが、その数は 2 Hz 以下に比べて少なかった。10 Hz では電圧入力時に細胞の収縮が見られたが、同期は見られなかった。

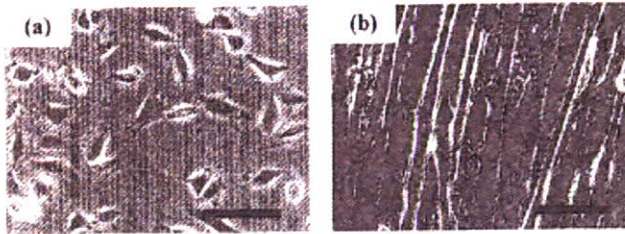


Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells at 2 hours (a) and at 10 days (b). Bar=100 μm

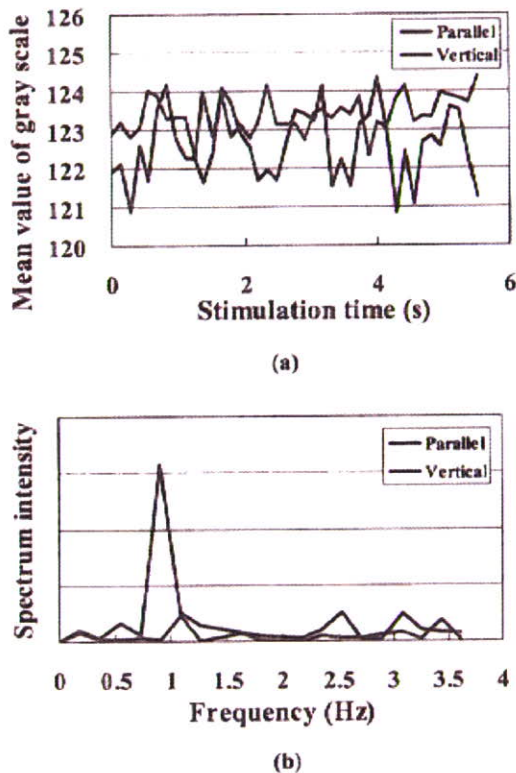


Fig.3 Results of image analysis of C2C12 contraction with electrical pulse at 10 days. (a) Mean value of gray scale, (b) Frequency spectrum.

図 3 に Strength-Duration curve を示した。本実験では、パルス幅 500 msec のときの電流を基電流とし、基電流の 2 倍の値のときのパルス幅をクロナキシーと定義した。Parallel および Vertical の基電流はそれぞれ 10.2 mA および 15.8 mA であった。また、Parallel および Vertical のクロナキシーはそれぞれ 2.2 msec および 7.1 msec であった。

4. 考察

本実験において、C2C12 細胞の収縮弛緩は 0.5 Hz から 2 Hz まで電気パルスと同期し、3 Hz 以上では同期する細胞数が少なかった。ここには示していないが、10 Hz のときの C2C12 細胞の収縮弛緩を画像解析したところ、電気パルス入力時にグレースケールの平均値が高くなり、刺激を続け

ている間はほとんど一定の値を示していた。このことから、同期しなかった細胞は、強縮が生じていたと考えられる。

パルス電気刺激により、筋を収縮弛緩させるために必要な電流値を基電流といい、最小の電気エネルギーで筋を収縮弛緩させるために必要なパルス幅をクロナキシーという⁽³⁾。電界方向が細胞の伸展方向に対して平行方向のとき、垂直方向より基電流およびクロナキシーが小さかった。このことは、筋管細胞と平行に電界を生じさせることで、少ないエネルギーで収縮弛緩させることが可能であることを示している。しかし、このような異方性が生じる原理について示すにはデータが少なく、今後さらに検討していく必要がある。一般に、骨格筋のクロナキシーは 0.1 msec から 0.3 msec ほどであり、本研究の値とは大きく異なる。本実験では、Strength-Duration 曲線に用いた電流は回路中を流れる電流であり、細胞に流れる電流ではない。そのため、骨格筋との比較は難しいが、このような測定系の違い、細胞の分化の段階、2 次元培養であったことなどが原因として考えられる。

このように、培養筋の収縮弛緩を制御するには入力する信号の大きさ、周波数およびパルス幅だけでなく、電界方向にも依存することがわかった。今後、C2C12 細胞を 3 次元培養し、培養筋のアクチュエータ化についてさらに検討していく予定である。

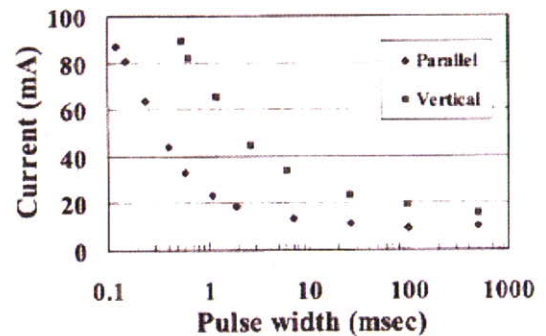


Fig.4 Strength-Duration curve.

5. 結論

本実験より以下の結論を得た。

1. 周波数により筋管細胞の収縮弛緩の動態が変化することが定量的に示された。
2. 筋管細胞には電界に対する異方性があり、筋管細胞に対して平行に電界をかけることで、低い電気エネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることができることが示唆された。

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。

参考文献

- (1) 星宮望, 赤澤堅造, 筋運動制御系, 昭晃堂, (1993)
- (2) 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
- (3) 宮島智, 岡久雄, 筋の振動特性とクロナキシー自動計測システムの開発, 信学技報, MBE2000-40, (2000) 9-16.

A112 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御

Control of myotube contraction by electrical pulse

○学 山崎健一 (阪工大院), 林宏行 (阪工大院), 小林裕之 (阪工大院),
宇戸慎仁 (阪工大院), 近藤英雄 (阪工大院), 正 橋本成広 (阪工大院), 藤里俊哉 (阪工大院)

Kenichi YAMASAKI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585

Hiroyuki HAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Hiroyuki KOBAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Sadahito UTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Hideo KONDO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Shigehiro HASHIMOTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Toshia FUJISATO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Key Words: Bio-actuator, C2C12 cell, Contraction, Electrical pulse, Chronaxie

1. 緒言

生体筋は軽量かつ小型で、出力対重量比が大きいアクチュエータである⁽¹⁾。現在、種々の材料を用いた人工筋の開発が進められているが、このような生体筋の特性を得るには至っていない。そこで、生体筋そのものをアクチュエータ (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。しかし、バイオアクチュエータとして、生体筋を用いると多くの動物を犠牲にする必要があるため、細胞から作製した培養筋を利用することが望ましい。このためには、培養筋の収縮弛緩を何らかの方法によって制御する必要がある。これまで、電気パルスによって筋管細胞の収縮弛緩を制御する試み⁽²⁾が報告されているが、筋管細胞の収縮動態の定量的評価や刺激条件の詳細な検討はなされていない。そこで本研究では、培養筋の収縮弛緩を制御するための刺激条件について検討し、収縮動態を定量的に評価することを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

筋芽細胞として、マウス横紋筋由来株化細胞C2C12細胞を使用した。C2C12細胞を直径60 mmのコラーゲンコートディッシュに細胞密度 1.0×10^4 cells/cm²で播種した。培養液には10%ウシ胎児血清 (FBS), 抗生物質を含むHigh-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM)を用いた。4日間培養した後、筋管細胞の形成を促進させるため、培養液を7%馬血清, 抗生物質を含むHG-DMEMに変更した。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形態の変化を観察した。培養は37℃, 5%CO₂, 湿度100%の環境下で行った。

2-2. 筋管細胞収縮の周波数特性

パルス電圧に対する筋管細胞の周波数応答性を調べた。図1に実験システムの概略図を示す。培養10日後に白金平板電極をディッシュの端部に設置した。Waveform generatorから培養液中にパルス電圧を印加した。電界の方向は筋管細胞の長軸に対して平行 (Parallel) および垂直 (Vertical) とした。パルス幅を20 msecとし、入力電圧を10 V_{p-p}から30 V_{p-p}、周波数を0.5 Hzから10 Hzまで変化させたときの筋管細胞の動態変化をコンピュータに取り込んだ。取り込んだ動画をフレーム毎の静止画に分割し、グレースケール (0-255)に変換した。収縮弛緩する筋管細胞の輪郭周囲を任意に選択し、その領域の平均値を求めた。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。

2-3. クロナキシー測定

培養10日目の細胞に周波数を1 Hzとして、入力電圧およびパルス幅を変化させ、筋管細胞が収縮するときの値を調べた。ディッシュと直列に100 Ωの抵抗を挿入し、その両端の電圧を測定することにより回路を流れる電流を算出した。筋管細胞が収縮し始めるときの電流とパルス幅との関係 (Strength-Duration curve) をグラフに示し、基電流とクロナキシーを求めた。すべての電気刺激実験は37℃、大気中でおこなった。また、周囲溶液には10%FBS, 抗生物質, 25 mM HEPESを含むHG-DMEMを使用した。

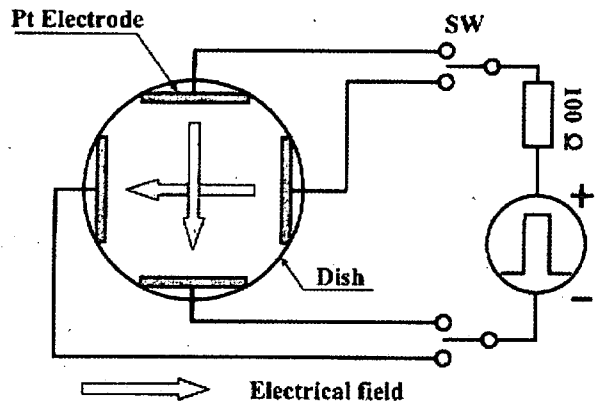


Fig.1 Schematic drawing of experimental system.

3. 結果

培養4日目に細胞がコンフルエントに達し、培養6日目には筋管細胞に変化している様子が見られた。また、培養8日目に自己拍動する細胞が見られた。図1に細胞播種2時間後および10日後のC2C12細胞の位相差顕微鏡画像を示した。単核の細胞が融合し、細長い筋管細胞に変化していた。

図2 (a)に入力電圧10 V_{p-p}, パルス幅20 msec, 周波数1 Hzのときの筋管細胞の収縮動態をグレースケールに変換した結果を示した。Parallelでは周期的にグレースケールの値が変化しているが、Verticalではそのような傾向が見られなかった。図2 (b)にグレースケールをフーリエ変換した結果を示した。Parallelでは1 Hzに強い周波数スペクトルのピークが見られるが、Verticalでは見られなかった。

入力電圧30 V_{p-p}において、周波数0.5 Hzから2 Hzまで周波数に同期してParallelの筋管細胞が収縮弛緩した。3 Hz

A115 電気インピーダンス法を用いた骨格筋の評価

Evaluation of skeletal muscle with electric impedance method

○ 学 近藤英雄 (阪工大院), 北孝之 (阪工大), 学 山崎健一 (阪工大院), 寺田堂彦 (阪工大),
正 橋本成広 (阪工大院), 藤里俊哉 (阪工大院)

Hideo KONDO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology,
5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585

Takayuki KITA, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

Kenichi YAMASAKI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Dohiko TERADA, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

Shigehiro HASHIMOTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Toshiya FUJISATO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Key Words: Skeletal muscle, Electric impedance, Enzymatic treatment, Tensile test, Water content

1. 緒言

近年、医療技術の発展に伴い損傷部に再生組織を移植する試みがなされている。一般に生体外培養により作製された再生組織の成熟を調べる方法として組織学的方法が用いられており、構築された再生組織の情報を得る上では有用な方法である。しかし、組織学的観察を行うためには再生組織から試料切片を作製する必要があるため、再構築された組織の一部が失われることになる。よって再生組織の成熟に伴う組織構造の変化を非破壊的に評価する技術が必要とされている。

骨格筋は筋繊維である細胞が配列し、集合することにより筋組織を成している。現在、生体外培養により培養筋を作製する試みがなされており⁽¹⁾、得られた知見は培養筋の臨床応用の可能性を示唆している。しかし、培養過程における培養筋の成熟を非破壊的に調べる方法は未だ確立されていない。そこで我々は、生体組織の内部情報を非破壊的に調べることが可能である電気インピーダンス法⁽²⁾に注目し、電気インピーダンスを用いることにより培養筋の成熟度を非破壊的かつ定量的に評価することが可能ではないかと考えた。しかし、骨格筋の構造と電気インピーダンスとの関係は明確になされていない。従って本研究では、骨格筋の組織構造と電気インピーダンスとの関係を調べることを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 酵素モデル

基質構造の変化が電気インピーダンスに及ぼす影響を調べるため、酵素処理により特定の基質を分解した酵素モデルを作製した。

2-1-1. 試験片

試験片には、食用豚(生後約6ヶ月、体重約100 kg)の大腰筋より採取した骨格筋を用いた。脂肪組織をピンセットで取り除き、外科用メスにより10×25×5 mmの板状に成形したものを試験片とした。乾燥を防ぐために試験片周囲を自作の亚克力ブロックで被い、4℃の環境下で保存した。

2-1-2. 酵素処理

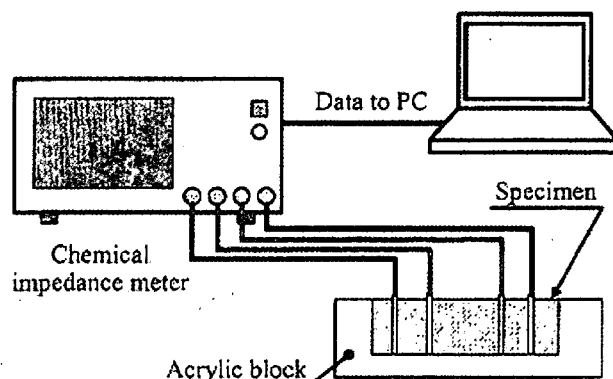
基底膜の構成成分であるコラーゲン線維を分解する酵素溶液としてコラゲナーゼ溶液を用いた。コラゲナーゼ溶液は、リン酸緩衝液(Phosphate Buffered Saline)(SIGMA, pH6.8)

にType-IVコラゲナーゼ粉末(Worthington, 280 unit/mg)を50 unit/mlの濃度で溶解することによって作製した。

酵素溶液10 ml中に試験片を入れ、37℃の恒温槽にて8時間酵素処理を行なった。酵素処理を施していない試験片をIntact群、コラゲナーゼ処理を施した試験片をCollagenase群とした。取り出した試験片を生理食塩水に1時間浸し十分平衡に達した後、各実験を行った。

2-2. 電気インピーダンス測定

図1に測定システムの概略図を示す。電気インピーダンスの測定にはケミカルインピーダンスメータ(3532-80, HIOKI)を使用した。試験片を自作の亚克力ブロックに設置し、φ0.5のステンレス電極を試験片に刺入した。電圧検出電極両端の電圧を10 mVrms一定のもと、4 Hzから1 MHzの交流電流を与えて各周波数における電気インピーダンスを測定した。得られた測定データはPCに保存された後、データ解析を行った。測定は室温環境下(25±1℃)で行った。



□: φ0.5 stainless electrode
Fig.1 Diagram of measurement system for electric impedance.

2-3. 引張試験

酵素処理に伴う骨格筋の引張方向の力学特性の変化を調べるために引張試験を行った。万能試験機(EZgraph, SHIMADZU)の治具に試験片を固定し、変位速度10 mm/minでクロスヘッドを移動させ、試験片が破断するまで試験を行った。得られた応力-ひずみ曲線より破断時の応力およびひずみを評価指標とした。

2-4. 含水率測定

酵素処理に伴う骨格筋の含水率の変化を調べた。湿潤状態にある試験片重量と、凍結乾燥を24時間行い十分に乾燥させた後の試験片重量とを電子天秤を用いて測定した。それぞれの重量を湿重量、および乾燥重量として含水率を算出した。

3. 結果

図2に含水率の測定結果を示す。Intact群に比べてCollagenase群の含水率は高かった。

図3に1kHz時の電気インピーダンスの測定結果を示す。Intact群に比べてCollagenase群の電気インピーダンスは低かった。

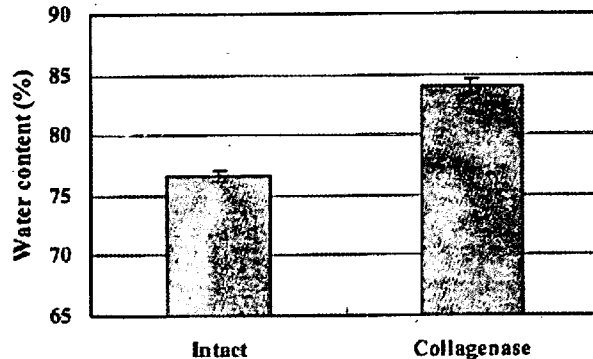


Fig.2 Results from water content measurement (Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

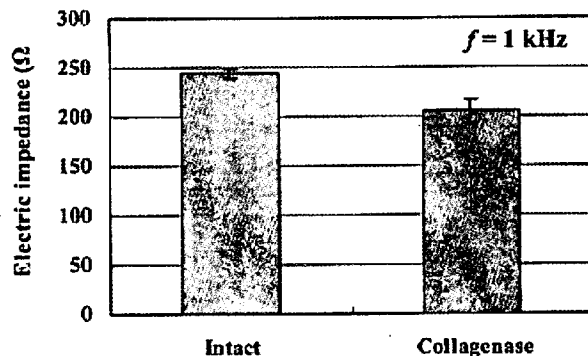


Fig.3 Results from electric impedance measurement (Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

図4に引張試験の結果を示す。Intact群に比べ、Collagenase群の破断応力は低い傾向を示したが、最大ひずみに顕著な差はみられなかった。

4. 考察

骨格筋は筋細胞である筋線維が集まり、筋周膜や筋上膜など深筋膜由来の結合組織が筋線維を束ねることによって構成されている。Intact群に比べてCollagenase群の含水率が高い値を示したのは、酵素処理により結合組織が分解された結果、筋組織が膨潤したためと考えられる。一般的に、生体組織においては組織内の水分量が高くなるにつれて電気インピーダンスが低くなると報告されている⁽¹⁾。Intact群に比べてCollagenase群の電気インピーダンスが低かったことより、骨格筋の電気インピーダンスは基質構造の変化に伴う水分状態の変化を捉えていることが示唆された。よって、電気インピーダンスの測定によって骨格筋の水分状態を調べることで、骨格筋の構造の変化を定量的に

評価することが可能であると考えられる。

また、Intact群に比べてCollagenase群の破断応力が低い傾向を示したことは、基質成分の分解によるものと予想される。従って、本研究における骨格筋の電気インピーダンス測定では、基質構造の変化に伴う力学特性の変化も予測できると考えられる。

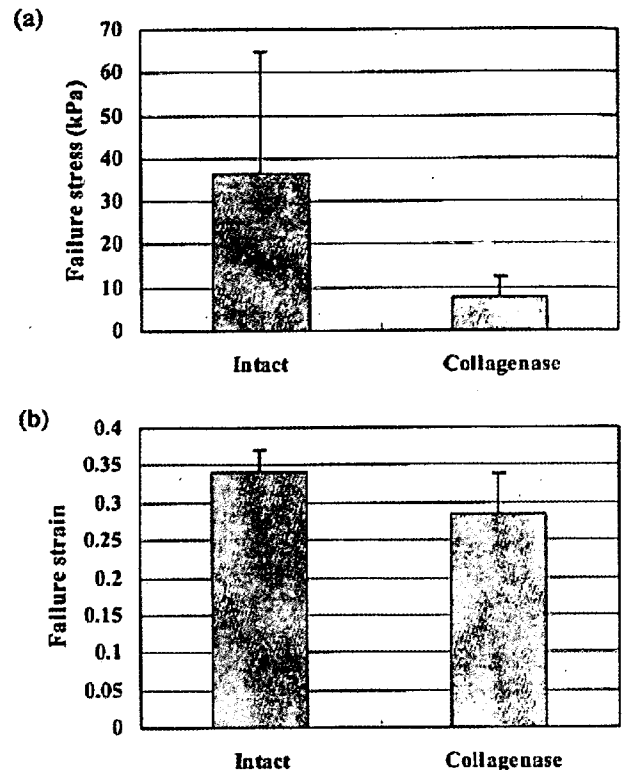


Fig.4 Results from tensile test ((a) failure stress, (b) failure strain, Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

5. 結言

酵素処理を施した骨格筋の電気インピーダンスを測定し、以下の結言を得た。

1. 基質構造の分解に伴い骨格筋の電気インピーダンスは低下する。
2. 骨格筋の電気インピーダンスは基質構造の変化に伴う水分状態の変化を捉えていることが示唆され、電気インピーダンス法により骨格筋の構造の変化を定量的に評価可能であることが示唆された。

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」による援助のもとでおこなわれた。

参考文献

- (1) Gregory H. Borschel et al., Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold, *Plast. Reconstr. Surg.*, 113, (2004), 595-602.
- (2) 岡部伸一, 藤田欣也, 電気インピーダンス法による筋収縮力の推定, *相模工業大学紀要*, 23(2), (1989), 77-81
- (3) 多田洋子他3名, 生体電気インピーダンス法による生体臓器の水分分布測定, *人工臓器*, 22(3), (1993), 999-1003.

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

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

Toshia Fujisato¹, Dohiko Terada¹, Kazuo Niwaya¹, Kenji Minatoya², Akiyo Kishida³, Takeshi Nakatani³, Sochiro Kitamura³

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 960 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 investigated. 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.

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

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

K. Yamashita¹, H. Hayashi¹, S. Uto², T. Ebashi³, S. Hashimoto¹, H. Terasaki², S. Mochizuki¹, H. Kondo¹, M. Yoshiura¹, T. Fujisato¹

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 20 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.

Poster Session(Regenerative Medicine / Tissue Engineering and Artificial Organs 1)

P1-056 ACELLULAR PORCINE CORNEA VIA ULTRA-HIGH PRESSURIZATION AS A SCAFFOLD FOR REGENERATION OF CORNEA

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 101-8562, Japan, ²Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 1138510, Japan, ³Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, 565-0853, Japan, ⁴Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Osaka, 565-0856, Japan, ⁵National Cardiovascular Center, Osaka, 565-0856, Japan, ⁶Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Ibaraki, 305-0844, Japan

T. Kimura¹, S. Funamoto¹, Y. Hashimoto^{1,3}, S. Susuki^{2,3}, M. Mochizuki^{2,3}, K. W. Nam^{1,4}, T. Fujimoto^{2,5}, T. Nakatani^{1,6}, S. Kitamura⁶, H. Kobayashi^{1,6}, A. Kishida^{1,6}

Background: Cornea tissue engineering is now widely accepted as one of the ultimate resolution curing eye diseases. Well-known technology is "Epithelial cell sheet" prepared by some methodologies. These methodologies are applicable only to the epithelial eye diseases. In order to prepare a tissue-engineered corneal scaffold for entire cornea regeneration, we are studying to prepare the cornea scaffold by decellularizing porcine cornea.

Methods: We decellularized porcine cornea by two methods: a detergent method and an ultra-high pressurization (UHP) method. Porcine corneas were immersed in 1% w/v Triton X-100 or SDS for 24 hours and washed with PBS for 24 hours, or were hydrostatically pressed at 4,000 or 10,000 atm at 10 or 20°C for 10 min.

Results and Discussion: Porcine corneas treated with detergent became swollen and turbid. The complete removal of cells was confirmed by HE staining. This result suggests that detergent treatment is not suitable for cornea decellularization. Using UHP method, semitransparent cornea was obtained by pressurization at 4,000 atm and 10°C. There was no change in the thickness of the cornea immediately after the pressurization, but the cornea became swollen during the washing process. This swelling behavior was inhibited by using a medium containing 3.5% w/v dextran. Furthermore, when the corneas were immersed in glycerol for 1 hour, their optical and mechanical properties were restored to those of a natural cornea. The decellularized cornea obtained through the UHP method could be useful as a corneal scaffold for tissue regeneration.

Regenerative Medicine / Tissue Engineering and Artificial Organs 2

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

¹National Cardiovascular Center Research Institute, ²Shimadzu Corporation, ³Ossia Institute of Technology

Ehashi T¹, Somekawa S¹, Udagawa H², Fujisato T^{1,3}

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 1.0×10^6 cells/mL. To inoculate cells into the scaffold, the non-needle injector (SHMAJet[®], 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.

P08 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養

○山崎 健一、寺田 堂彦、近藤 英雄、橋本 成広、藤里 俊哉

大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻

【目的】生体筋は出力対重量比が大きいアクチュエータである。現在、このような特性を有するアクチュエータは存在しないことから、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。そこで本研究では、機械的強度があり、形状の制御が比較的容易な脱細胞化した生体由来組織を、C2C12細胞のスキヤフォールドとして3次元培養し、バイオアクチュエータとしての機能を評価した。【方法】熱架橋によって固定化処理を施したブタ大動脈を Tris-Buffer で希釈したエラストマーゼ中に浸漬し、大動脈からエラスチンを分解除去した。続けて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い、脱細胞スキヤフォールドを作製した。得られたスキヤフォールドに、C2C12細胞を 1.0×10^6 cells/ml の濃度で $100\mu\text{l}$ 播種した。1時間静置後に10%FBS、抗生物質を含む High-glucose DMEM を加えて5日間培養した。5日後に10%FBSを7%HSへと変更してスキヤフォールドに接着したC2C12細胞の融合を促進させた。培養9日目に培養液中に電気パルスを加し、培養筋の動態変化を位相差顕微鏡で観察するとともに、HE染色を行って断面の様子を観察した。【結果】入力電圧10 Vp-p、周波数1 Hz、パルス幅20 msecのパルス電圧に同期して培養筋が収縮弛緩した。周波数を10 Hzにすると強縮が生じた。HE染色の結果、細胞はスキヤフォールドの表面に多く接着しており、ほとんど内部には没入していなかった。これらのことから、スキヤフォールド表面に細胞が接着するだけで、培養筋が収縮弛緩し、さらに強縮することがわかった。今後、スキヤフォールド内部に細胞を没入させることで、高出力なバイオアクチュエータを創生することが可能となると考えられる。【結論】無細胞生体由来組織は培養筋のスキヤフォールドとして有用であることが示唆された。

組織工学的的手法による人工角膜の開発

○船本誠一^{1) 3)}, 橋本良秀^{1) 3)}, 南 広祐¹⁾, 佐々木秀次^{2) 3)},
望月學^{2) 3)}, 藤里俊哉⁴⁾, 木村剛^{1) 3)}, 小林尚俊^{1) 3)}, 岸田晶夫¹⁾

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

1. 緒言

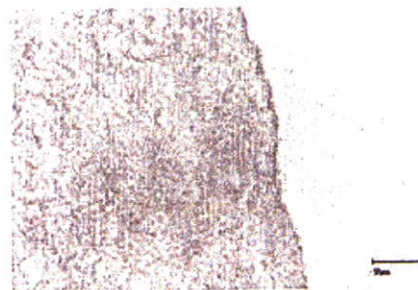
人工角膜として、これまでに多くの材料研究が行われているが、移植後の感染や脱落により、長期間有用である人工角膜の開発には至っていない。一方、異種組織から細胞を除去し、残存する基材を移植組織として用いるために、組織の脱細胞化が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高压印加により組織内の細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高压脱細胞化法を考案した。本手法で、細胞の除去による免疫反応の抑制と生体の微小構造の保持による適合性の向上が期待できる。本研究では、超高压脱細胞化法による人工角膜の作製とその物性解析を行ない、角膜移植片としての可能性を検討した。また、他の脱細胞法である界面活性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。

2. 実験

成体ブタの眼球を購入し、角膜を採取した。界面活性剤は Triton-X 100 と SDS を用いた。それぞれの 1% の溶液に角膜組織を浸漬し、37°C にて 24 時間脱細胞化処理を行った。脱細胞化処理後に H&E 染色を行い、脱細胞化を評価した。一方、超高压脱細胞化法には、冷間等方加圧印加装置（神戸製鋼社製）を用い、10°C 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、細胞残渣を除去することで脱細胞化組織を得た。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。

3. 結果と考察

超高压処理および界面活性剤による脱細胞化を H&E 染色で評価した。H&E 染色標本において、界面活性剤を用いた脱細胞化では、多数の細胞核の染色が確認され完全な脱細胞化はされていなかった。また、コラーゲン線維の断裂と配向の乱れが観察された。このことより角膜の脱細胞化には界面活性剤は適していないと言える。これに対して UHP 処理における組織では、内部の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。



本研究は、厚生労働省科学研究費の助成を受けて行われた。 Fig. H&E staining of decellularized cornea by ultra-high hydrostatic pressure

Development of artificial cornea by tissue engineering

Seiichi FUNAMOTO^{1),3)}・Yoshihide HASHIMOTO^{1),3)}・Kwangwoo NAM¹⁾・Syuji Sasaki^{2),3)}・Manabu Mochizuki^{2),3)}・
Toshiya Fujisato⁴⁾・Tsuyoshi Kimura^{1),3)}・Hisatoshi Kobayashi^{1),3)}・Akio Kishida¹⁾

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

2) Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Japan, 3) Biomaterials Center,
National Institute for Material Science, Tsukuba, Japan, 4) Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of
Technology, Osaka, Japan

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

生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討

○ 近藤英雄¹, 北孝之², 寺田堂彦², 山崎健一¹,橋本成広¹, 藤里俊哉¹¹大阪工業大学大学院 工学研究科, ²大阪工業大学 工学部

1. 緒言

電気インピーダンス法とは微小な交流電流を流すことにより生体組織の構造を非破壊的に推定する技術であり, 体脂肪率の測定や患者の浮腫の診断, 乳がんの診断などに用いられている. 先行研究の報告によると, 生体組織の電気インピーダンスは組織内部の水分状態に影響を受けるとされているが, 基礎的な検討や機序の解明に関する報告例は少ない. そこで我々は, 水分量が調節可能な生体高分子ゲルを擬似生体組織とし, 電気インピーダンス法の詳細な検討を行うことが機序解明における一助となると考えた. 従って本研究は, 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的な検討を行うことを目的とした.

2. 実験方法

生体高分子ゲルとしてゼラチンを使用した. 60℃に加熱した蒸留水にゼラチン粉末(SIGMA)を加え, 濃度の異なるゼラチン溶液を作製した. 得られた溶液に電解質として塩化ナトリウムを加え, 完全に溶解したのを確認した後, 自作の型に流しこんで4℃で12時間冷却した. ゲル化したのを確認した後, 電気インピーダンス測定を行った. 測定は空气中, 室温環境下(25±1℃)で行った. φ0.5のステンレス電極をゲルに刺入し, 電圧検出電極 10mVrms 一定のもと周波数 4 Hz から 1 MHz における交流電流を流し, 電気インピーダンスの測定を行った. 得られたデータを PC に保存後, Cole-Cole plot によりデータ解析を行った. また, 万能試験機を用いて圧縮試験を行いゲル強度を測定した.

3. 結果および考察

周波数の変化に伴い生体高分子ゲルの電気インピーダンスは変化し, 典型的な円弧の軌跡が得られた. 図1に電気インピーダンスと含水率との関係を示す. 水分量の上昇に伴い電気インピーダンスは低下する傾向が見られた. また, 塩濃度の上昇に伴い電気インピーダンスは低下する傾向が見られた. よって, 本研究で得られた生体高分子ゲルの電気インピーダンスは, 電解質溶液の水分状態に依存することが示された.

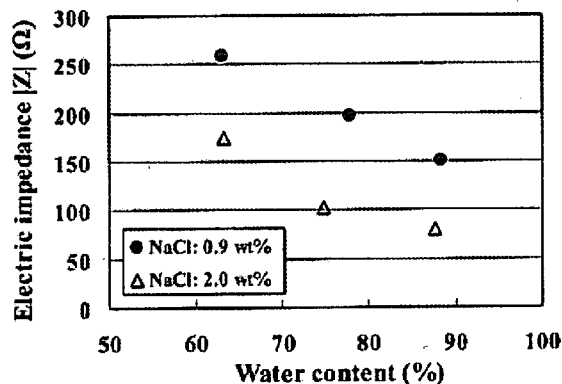


Fig.1 Relation between electric impedance and water content.

Fundamental study on electric impedance method using biopolymer gel

Hideo Kondo¹, Takayuki Kita², Dohiko Terada², Kenichi Yamasaki¹,
Shigehiro Hashimoto¹, Toshiya Fujisato¹¹Graduate School of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology²Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

5-16-1, Ohmiya, Asahi-ku, Osaka, 5335-8080, Japan

E-mail: m1206h01@eng.oit.ac.jp Tel:+81-6-6954-4476 Fax.:+81-6-6954-4463

高親水性高分子を用いた人工血管用スキャホールドの作製と評価

○佐々木愛¹、柿木佐知朗¹、馬原淳¹、中谷武嗣²、山岡哲二¹¹国立循環器病センター研究所 生体工学部²国立循環器病センター 臓器移植部

1. 緒言

臨床で使用されている人工血管は生体組織と置き変わることがないため、成長に伴って再手術を行う必要がある。一方、自己の組織を再生させる再生型人工血管はこのような問題点を克服できると期待されている。特に、直径が2~4mmの再生型小口径人工血管は、冠動脈疾患の治療にも応用できるために強く期待されている。再生型人工血管には、力学的強度や柔軟性の維持、および血栓の抗吸着性などの性質が求められ、様々な高分子材料の設計が試みられている。本研究では、内層がポリ-L-乳酸(PLLA)とポリエチレングリコール(PEG)とのマルチブロック共重合体、外層が PLLA のナノファイバーからなる二重構造のスキャホールドを作製した。この人工血管では内層のマルチブロック共重合体が有する親水性により高い抗血栓性が期待でき、また外層の PLLA により力学的強度を補う。エレクトロスピニング法の緒条件を変えて二重構造小口径人工血管を作製し、その構造と力学的特性を検討するとともに、全血および PRP (platelet rich plasma) を用いた抗血栓性についても評価した。

2. 実験

PLLA (三井化学, Mw=20,000)、および PEG (和光純薬工業(株), Mw=30,000) を 7:3 で仕込み、酸化スズを触媒としてマルチブロック共重合体を合成した。13kV を印加したシリンジ先端よりポリマー溶液を吐出し、回転する直径 4mm のステンレス棒によりファイバーを巻き取ることで中空構造を有する人工血管を作製した。初めに、クロロホルムで調整した 10wt% のマルチブロック共重合体を壁厚 100 μ m まで巻き取り、その後 10wt% の PLLA により壁厚 600 μ m とした。ファイバーの巻き取り速度、およびシリンジからステンレス棒までの距離を変えて種々の人工血管を作製し、走査型電子顕微鏡 (SEM)、また引っ張り試験により構造と力学的強度を検討した。またキャストフィルムに対する、血栓吸着性は SEM により評価した。

3. 結果と考察

得られたマルチブロック共重合体の分子量は 60,000 であった。巻き取り速度を 109rpm から 50rpm まで減少させた結果、ファイバー径が約 5 μ m から 15 μ m へ変化し (図 1. A, B)、それぞれの破断応力は約 1.69 および 3.15MPa であった。一方、SEM 観察より針先からステンレス棒の距離が 12 および 8cm の場合には、網目の構造を形成し一本一本の繊維が独立しているのに対し (図 1. D)、6cm の場合には繊維間の接着が観察できた (図 1. C)。4cm では網目構造が形成しなかった。以上の結果より、ファイバー径が約 15 μ m 付近で、ファイバー間が接着する構造が人工血管の強度を高めるための重要な条件であることが示された。全血及び PRP での血栓吸着試験においてマルチブロック共重合体の評価なども合わせて報告する。

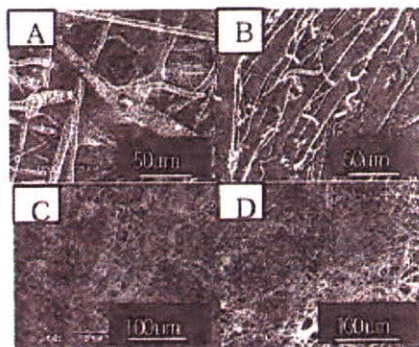


図 1. エレクトロスピニング条件が繊維径に与える影響。巻き取り速度・距離 = (A) 50rpm・8cm, (B) 109rpm・8cm, (C) 50rpm・6cm, および (D) 50rpm・12cm.

Fabrication and evaluation of artificial blood vessel scaffold utilizing highly hydrophilic polymer

Ai SASAKI¹, Sachiro KAKINOKI¹, Atsushi MAHARA¹, Takeshi NAKATAN², Tetsuji YAMAOKA¹

¹Department 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 2637) FAX:+81-6-6835-5476 E-mail :yamtel@ri.ncvc.go.jp

²Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center.

ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養

○奈良雅尚¹, 山崎健一¹, 寺田堂彦¹, 澤田和也²,
近藤英雄¹, 橋本成広¹, 藤里俊也¹

1 大阪工業大学工学研究科生体医工学専攻

2 大阪成蹊短期大学総合生活学科

1. 緒言

生体の筋組織は出力対重量比が大きく、アクチュエータとして優れた特性を有する。培養した筋細胞をアクチュエータ化するためには、筋組織と同様に細胞を高密度に集積させ、一方向に配向させる必要がある。これまでゲルや繊維を用いた培養筋の作製が試みられているが、ゲルを用いた場合には培養筋中の細胞は低密度となり、初期の強度が弱く、バイオアクチュエータとして用いるには難しい。一方、繊維を用いた場合には培養筋中の細胞は高密度となり、繊維そのものが強度を有しているため、バイオアクチュエータ用スキャフォールドとして有用であると考えられる。繊維を用いた培養筋の研究では、初期の細胞接着数が少なく、培養筋の収縮動態の評価はなされていない。本研究では、コラーゲンゲルをコートした繊維を用いて筋芽細胞の三次元培養を行い、繊維-コラーゲン複合体の有用性と培養筋の収縮動態を評価することを目的とした。

2. 実験方法

スキャフォールドとなる繊維には直径 20 μm のポリプロピレン繊維を用いた。繊維を等間隔に配列させ、その上に Type-I コラーゲンゲルを薄くシート状にコートした。得られたスキャフォールドに、マウス横紋筋由来の株化細胞である C2C12 細胞を播種した。10%ウシ胎児血清と抗生物質を含む High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium で 6 日間培養した。6 日後、10%ウシ胎児血清を 7%馬血清に変更し、C2C12 細胞の筋管細胞への分化を促進させた。培養液の交換は 2 日毎に行い、その際に位相差顕微鏡で細胞の形態を観察した。分化誘導してから 1 週間後に電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮動態を調べた。

3. 結果

作製したスキャフォールド上では C2C12 細胞が増殖し、6 日目にはコンフルエントになった。馬血清に変更してから 4 日後には筋管細胞に分化している様子が見られた。培養日数の経過に伴い、培養筋が繊維の中央部分に縮む様子が見られた。入力電圧 30 V_{pp} 、周波数 1 Hz から 3 Hz、パルス幅 20 msec の電気パルスを培養液中に印加したところ、筋管細胞が周波数に同期して収縮する様子が観察された。コラーゲンゲルをコートしていない繊維と比較したところ、コートすることによって初期の細胞接着数が増加することがわかった。電気パルスによって収縮弛緩したことから、ポリプロピレン繊維-コラーゲン複合体は培養筋のスキャフォールドとして有用であることが示唆された。

Three dimension culture of C2C12 cells on polypropylene fiber scaffold.

Masanao NARA¹, Kenichi YAMASAKI¹, Dohiko TERADA¹, Kazuya SAWADA², Hideo KONDO¹, Shigehiro HASHIMOTO¹ and Toshia FUJISATO¹

¹Graduate school of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585, Japan

Tell: +81-6-6954-4457, FAX: +81-6-6954-4463, E-mail: m1107h05@eng.oit.ac.jp

²Department of Integrated Life, Osaka Seikei College

超高静水圧印加処理による脱細胞神経グラフトの作製

○西垣戸麻美¹⁾、江橋 具²⁾、山岡哲二¹⁾、藤里俊哉^{2,3)}

- 1) 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部
 2) 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

顔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。

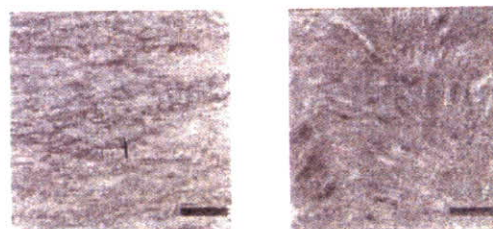
われわれは、脱細胞化神経に残った神経構成タンパク質の組成や構造が、神経の再生を促進すると考え、本研究グループで開発された超高静水圧印加処理による脱細胞化処理法を用いて、脱細胞神経グラフトを作製した。

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、超高静水圧印加装置を用いて 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、細胞残渣を除去するため、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 日間エ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、超高静水圧脱細胞処理により、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

Mami NISHIGAITO, Tomo EHASHI, Tetsuji YAMAOKA, Toshia 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@ri.ncvc.go.jp

O-156 Tissue-derived Scaffold for Aortic Root Reconstruction

Toshia Fujisato¹, Toshia Fujisato¹, Ken'ichi Yoshida²,
Dohiko Terada¹, Kazuo Niwaya², Kenji Minatoya²,
Akio Kishida², Takeshi Nakatani², Soichiro Kitamura²
(Osaka Institute of Technology¹, National Cardiovascular Center², Tokyo
Medical and Dental University³)

OBJECTIVES Biodegradable materials such as polylactide and/or polyglycolide are commonly used for the scaffolds for tissue engineering, whereas it is not easy to have enough mechanical strength especially in the aortic tissue. In this study, tissue-derived scaffold has been developed by an elimination of cellular components by the ultra-high pressure from porcine aortas. **METHODS** Porcine aortas were treated by the ultra-high pressure of 980 MPa followed by rinsing residual cellular components away by PBS-based washing solution and alcohol. This treatment does not include any processes using detergent. The scaffolds were substituted for descending aorta of miniature pigs through left thoracotomy in the surgery carried out with single clamp technique. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 3, 6, and 12 months after the implantation and examined histologically and immunohistologically. **RESULTS** There were no cellular components observed in the tissues treated. The amounts of DNA and phospholipids were lower than 5% of the native. 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 6 months. The grafts followed host tissue growth about 1.5 times in diameter and length after 12 months. There were calcium deposits slightly observed in the graft especially at the anastomosis. **CONCLUSIONS** This process eliminates cellular components completely and may be useful for having regenerative scaffolds for the vascular tissue regeneration.

P-047 Preparation of Condensed Plasmid DNA Using High Pressure Technology for Gene Delivery

Tsuyoshi Kimura¹, Kana Horiuchi², Kimio Kurita³,
Tsutomu Ono⁴, Hidekazu Yoshizawa⁵, Tsutomu Furuzono¹,
Kwangwoo Nam¹, Toshiya Fujisato⁵, Akio Kishida¹
(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University¹, Department of Materials and Applied Chemistry, Nihon University², Gradual School of Environmental Science, Okayama University³, Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute⁴, Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology⁵)

We investigated the effect of pressure on tertiary structure of plasmid DNA in order to develop a novel method for condensing plasmid DNA. The solution of plasmid DNA was hydrostatically pressurized at various atmospheres for different time. After pressure removal, the obtained solutions of plasmid DNA were analyzed by dynamic light scattering measurement. For non-pressurized plasmid DNA, the super-coiled and relaxed plasmid DNA was individually detected. Their hydrodynamic sizes were decreased with increasing pressure strength and period of pressurization. Previously, it was reported that high pressure induced super-coiling of a relaxed plasmid DNA. So, the decrease in the size of super-coiled plasmid DNA was regarded as the condensation of super-coiled plasmid DNA. For AFM observation of the dried plasmid DNA without pressurization, the fibril and circular structures, which were super-coiled and relaxed forms of plasmid DNA, were observed, whereas the spherical structure of the condensed plasmid DNA was observed. From these results, it was found that the condensation of plasmid DNA could be controlled using high pressure technology. Also, the condensed plasmid DNA was significantly transcribed and translated in cell-free transcription/translation system. These results suggest that the condensed plasmid DNA by high pressurization could be utilized for gene delivery.

● Poster Presentations

**P-089 Characterization of Acellular Porcine Cornea
Prepared by Ultra-high Pressurization as Artificial
Cornea**Tsuyoshi Kimura¹, Seiichi Funamoto¹, Yoshihide Hashimoto¹,Syuji Sasaki², Manabu Mochizuki², Kwangwoo Nam³,Toshiya Fujisato⁴, Takeshi Nakatani⁵, Soichiro Kitamura⁶,Hisatoshi Kobayashi⁷, Akio Kishida¹

(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University¹, Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University², Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology³, National Cardiovascular Center⁴, Biomaterials Center, National Institute for Materials Science⁵)

We investigated the decellularization of porcine cornea by ultra-high hydrostatical pressurization (UHP) method. The UHP method consists of the disruption of cells by hydrostatical pressurization and the removal of components of the disrupted cells by washing process. Porcine corneas were hydrostatically pressed at 4,000 or 10,000 atmospheres and 10 or 30°C for 10 min and immersed in medium for 72 hours. Semitransparent cornea was obtained by pressurization at 4,000 atm and 10°C. The transparency of cornea was decreased under the high pressure and temperature condition. By H-E staining, the complete removal of epithelial and stromal cells and the maintenance of the superstructure of collagen fibrils were confirmed in all of the pressurized corneas. Furthermore, the transmission of the pressurized corneas was recovered by the immersion of them in glycerol and the mechanical property similar to native cornea was shown. Also, there was no change in the conformation of collagen in solution by UHP treatment. These results indicate that the decellularized cornea by UHP method would be useful as corneal scaffold for regeneration. Also, these results suggest the possibility of the acellular cornea prepared by the UHP method as artificial bio-cornea.

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 Clawn 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 the 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 the 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.

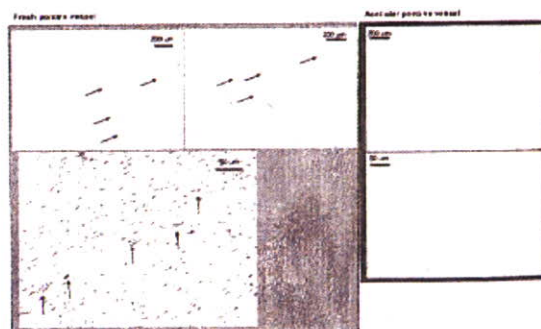


Fig.1 Immunostaining of anti-alpha-galactose in the native (left) and acellular (right) tissues.

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.

Reconstruction of small diameter arteries using acellular vessel scaffold

Y. Saitoh*, M. Katanoda**, H. Yamada**, T. Fujisato***, T. Kimura*, A. Kishida*, K. Takakuda*

* Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

** Kyusyu Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka, Japan

*** National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka, Japan

Introduction

The patency of artificial vessels of small diameter is low and their clinical application has not yet succeeded. However, their development is clinically demanding, since presently available peripheral vascular autografts and allografts have many drawbacks. Acellular scaffolds are recently developed tissue engineering scaffolds which are made from living tissues through the acellularized process and comprised of extracellular matrix alone. These scaffolds had been reported to successfully reconstruct the heart valves and aorta and demonstrated good patency and migration of cells. Hence in this study, we investigated the possibility of the reconstruction of small diameter artery with this kind of grafts. Acellular scaffolds were prepared from the arteries of rats, and their mechanical characteristics were examined and transplantation experiments were performed.

Materials and Methods*Fabrication of the acellular vessel scaffold.*

Arterial segments were obtained from Sprague-Dawley rats. Vessels were acellularized by ultra-high pressure process. The tissue was treated by the cold isostatic pressing of 10 k atm for 10 min, and washing for one day. The silicone tubes were chosen as the control.

Mechanical test.

In order to examine the mechanical characteristics of the acellular scaffolds, we performed mechanical testing of the scaffolds in which pressure was applied to the scaffolds intraluminally and their diameter was measured. The control of this experiment was freshly retrieved abdominal aorta of rat.

Animal experiment.

The common carotid arteries of SD rat were implanted with the scaffold with 10 mm in length. The implantation period was scheduled to be 4 weeks. Scaffolds patency was evaluated with direct observation of blood flow through the scaffold at the time of its retrieval.

Histological examination.

The samples were fixed with formalin, dehydrated, embedded in paraffin; and their thin sections were prepared. The sections were stained with HE stain and immunologically stained with factor VIII-related antigen (for EPCs) and anti-smooth muscle α -actin (for smooth muscle cells) to identify the cell types migrated into arterial walls of the grafts.

Results and Discussion*Mechanical measurements.*

The overall results of the pressure-diameter relations of scaffolds and vessels are summarized in Fig. 1.

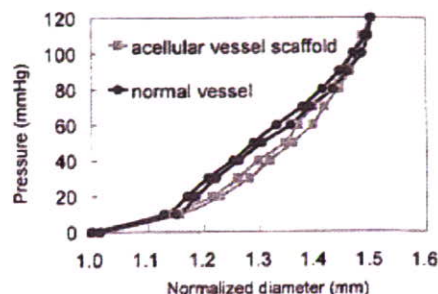


Fig. 1 Pressure-diameter relations of scaffolds and vessels

Patency.

The overall results on the patency of the implanted scaffolds are summarized in Table 1.

Table 1. Patency rate of transplantation for 4 weeks

	persistence	occlusion	Patency rate
Acellular vessel scaffold	5	1	83%
Silicone	0	5	0%

Histological findings.

The histological observations were presented in Figs. 2 and 3. Monolayered cells on the luminal surface of the graft were positive with the factor VIII related antigen for EPCs, as shown in Fig. 2. And cells positively stained with smooth muscle cell-specific α -actin, were observed in the tissue beneath the luminal surface, as shown in Fig. 3.

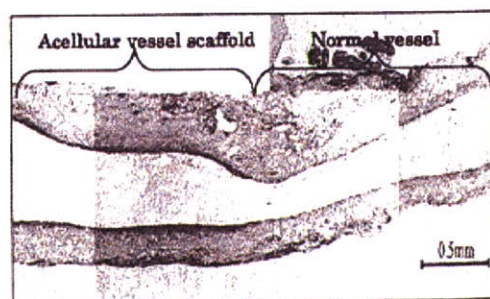


Fig. 3 Acellular vessel scaffold (F VIII staining)

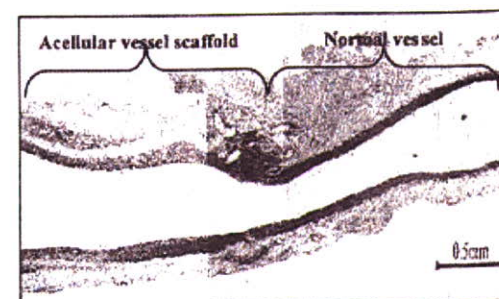


Fig. 4 Acellular vessel scaffold (α -SMA staining)