

Development of Acellular Cornea as an Artificial Cornea

S Funamoto^{1,2}, Y Hashimoto^{1,2}, S Sasaki³, M Mochizuki³, T Kimura^{1,2},
T Fujisato⁴, H Kobayashi^{1,2}, A Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

²Biomaterials Center, National Institute for Material Science, Tsukuba, Japan

³Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Japan

⁴Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

Introduction

The success rate of cornea transplantation is high compared to other form of tissue transplantation, but many complications still occur. Also, an absolute shortage of donor corneas has been an important problem in many countries. Artificial corneas have been studied as alternative in order to overcome these problems. Although various synthetic biocompatible polymer materials have been tested, some of which were recently approved by the FDA and clinical test data is accumulating. However, it has often been reported that such implants fail to significantly connect to corneal tissue and the recipient corneal cells do not expand on or in these materials, resulting in the extrusion of them through melting around the prosthetic rim.

In this study, we investigated the chemical and physical decellularization methods of corneas, in which the cells and antigens are removed to diminish the host immune reaction but the biological structure is remained, in order to utilize the decellularized cornea as a novel artificial bio-cornea. Decellularization of cornea was carried out by chemical and physical methods using various detergents and ultra-high hydrostatical pressurization (UHP), respectively.

Materials and methods

Tissues.

Corneas were dissected out of oculars of freshly killed mature pigs and washed in phosphate-buffer saline (PBS) containing antibiotics and 3.5 % w/v dextran.

Decellularization of corneas by chemical method.

1% w/v solutions of Triton X-100 and of SDS were prepared. The cornea was immersed in one of these at 37 °C for 24 hours, washed with PBS containing penicillin and streptomycin for 48 hours, and subject to histological study (hematoxylin-eosin (H-E) staining).

Decellularization of corneas by UHP method.

The corneas were pressurized at 10,000 atm at 10 °C for 10 min using a high-pressure machine (Kobe Steel Ltd.), washed with EGM-2 medium containing DNase I (0.2 mg/ml), antibiotics and 3.5 % w/v dextran at 37°C for 3 days, and then subjected to histological study.

Biochemistry.

Decellularized corneas were analyzed quantitatively by biochemical assays for residual DNA and GAG. *Characterization of decellularized cornea.*

Decellularized corneas were investigated characteristics such as the transmittance, swelling ratio, strength.

Preliminary animal implantation study.

To examine the biocompatibility of decellularized cornea, they were implanted in rabbit corneal stroma. The animals were sacrificed at 8 weeks after implantation.

Results and Discussion

Decellularized corneas by chemical method were cloudy and swollen after immersion in a detergent solution. For H-E staining of a section of the decellularized cornea, loosening of the collagen fibrils in the corneal stroma and shrinking of the epithelium layer were observed. Although the disruption of cells was confirmed histologically, the nuclear materials of the disrupted cells remained.

By H-E staining, the complete removal of epithelial and stromal cells was confirmed in all of the pressurized corneas. The super-structure of collagen fibrils were relatively maintained after the UHP decellularization. Also, when the decellularized porcine cornea was implanted in a rabbit cornea, vascularization and inflammatory reaction were not observed, suggesting the decellularized cornea obtained through the UHP method could be useful as a corneal scaffold for tissue regeneration. From these result, it suggested that this method could be used as one of decellularization method of the other tissues or organs.

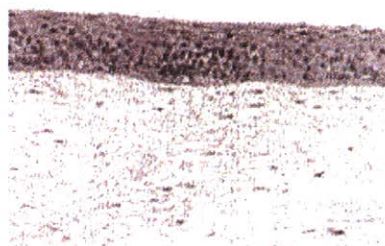


Figure.1 H-E staining of native (upper) and decellularized cornea (lower) by UHP method.

Conclusion

We have successfully developed a corneal decellularization method that uses UHP technology. The superstructure of the acellular cornea was relatively preserved. This decellularization method appears to be a promising contribution with regard to corneal replacement and tissue engineering of the cornea.

Acellular skeletal muscle scaffold as an inducer of muscular differentiation

T. Ehashi¹, S. Hashimoto², T. Fujisato²

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

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

Introduction

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

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

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

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

Materials and Methods

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

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

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

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

Results and Discussion

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

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

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

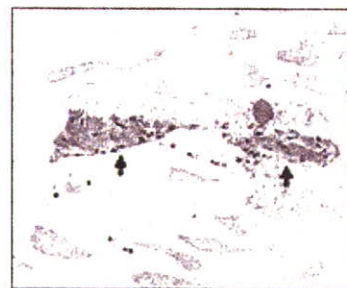


Figure. In the acellular skeletal muscle scaffold, myoblast cells demonstrated skeletal fiber-like morphologies after 6 days of static culture (arrows).

Conclusions

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

DNA condensation using hydrostatic pressurization for gene delivery

T. Kimura¹⁾, K. Horiuchi²⁾, K. Kurita²⁾, T. Ono³⁾, H. Yoshizawa³⁾, T. Fujisato⁴⁾, A. Kishida¹⁾,¹⁾Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, ²⁾Nihon University, Tokyo, Japan, ³⁾Okayama University, Okayama, Japan, ⁴⁾Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

Introduction

Plasmid DNA was utilized for gene transfection into mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Mainly, plasmid DNA was condensed by various cationic compounds, which can interact with plasmid DNA electrostatically, in order to be stable for nuclease degradation and to be effectively delivered into cells. Although the transfection efficiency was enhanced using these methods *in vitro*, their cytotoxicity is one of essential problems. On the other hands, it was reported that when plasmid DNA was directly injected into muscle, liver, and heart *in vivo*, called as naked plasmid DNA method, the transgene was transiently expressed. Although this method is simple and safe, the level of transgene expression resulting from such local regional administration is relatively low and restricted to the injection site due to its low stability. Therefore, for safer, more stable and efficient gene delivery, it is necessary to condense plasmid DNA with a less cationic material or without one. In our previous study, it was reported that nanoparticles of poly(vinyl alcohol) (PVA) itself or its mixture with plasmid DNA were prepared via hydrogen bonds by ultra-high hydrostatic pressurization, in which the hydrogen bond is strengthened, and were delivered into mammalian cells with low cytotoxicity. In the present study, we hypothesized that the pressure induces the compaction of plasmid DNA itself because DNA is one of typical hydrogen bonding polymers as well as PVA, and then we investigated the effect of pressure on the tertiary structure of plasmid DNA having the super-coiled and relaxed forms. Kunugi et al previously reported that the elevated pressure to 160 MPa induced the super-coiling of relaxed plasmid DNA.

Materials and Methods

1kbp ladder DNA (Takara, Co. Ltd) was used as a linear DNA. Plasmid DNA encoding luciferase under T7 promoter (pT7-luc, Promega Co.) was also used. Aqueous solution of them (20 µg/ml) was prepared and hydrostatically pressurized at various atmospheres and 40 °C for different times using high pressure machine (Dr.chef, Kobe Steel Co. Ltd). After pressure removal, the obtained solution was analyzed by agarose gel electrophoresis, DLS (Nano-Zs, Malvern Instruments Ltd), CD (J-820, JASCO Co. Ltd) and melting temperature (T_m) at 260 nm (V-560, JASCO Co. Ltd) measurements.

Results and Discussion

For 1kbp ladder DNA, when the DNA solution was hydrostatically pressurized at 10,000 atm (980MPa) and 40 °C for 10 min, there was no change for the agarose gel electrophoresis of the ladder DNA with/without the pressurization, whereas the decrease in the size of the pressurized DNA was confirmed by DLS measurement compared to that of the non-pressurized DNA. Also, there were differences between the ladder

DNA with and without the pressurization for CD and T_m measurements. These results suggest that the condensation of DNA was induced by the pressurization.

Secondary, plasmid DNA was used in order to examine the effect of pressure on the conformational structure of DNA in detail. The aqueous solution of pT7-luc at the concentration of 20 µg/ml was hydrostatically pressurized at 10,000 atm and 40 °C for 20 min and analyzed by DLS measurement. Before the pressurization, the hydrodynamic diameter of pT7-Luc solution was detected at approximately 95 nm and 625 nm, which were assigned to the super-coiled and relaxed (open-circled) form of pT7-luc plasmid DNA, respectively. After the pressurization, the hydrodynamic diameters of the pT7-luc were measured at approximately 27 nm and 127 nm. It was previously reported that super-coiling of plasmid DNA was induced by elevated pressure to a relaxed plasmid DNA at 160 MPa. Thus, the pT7-luc having the diameter of 127 nm obtained by the pressurization at 10,000 atm was regarded as super-coiling of relaxed pT7-luc plasmid DNA. It is also considered that the super-coiled pT7-luc was effectively condensed by the high pressurization, resulting that the compacted super-coiled pT7-luc was detected at approximately 27 nm. To investigate whether the pressurizing strength and time affect the compaction of plasmid DNA, the pT7-luc solution was pressurized at different atmospheres and 40°C for various times. For DLS measurement after pressure removal, the hydrodynamic diameters of the super-coiled and relaxed plasmid DNA were decreased with increasing pressure. Also, at constant pressure at 10,000 atm, a long period of pressure treatment effectively induced the compaction of pT7-luc. These results suggest that the hydrostatic pressurization could regulate the tertiary structure of plasmid DNA. To investigate the function of the pressure-condensed plasmid DNA, the activity of luciferase expressed from the pT7-luc pressurized at various atmospheres for 5min in cell-free translation and translation system was evaluated. The luciferase activity of the pressurized pT7-luc at 5,000 atm was increased about 1.8 times compared to the non-pressurized one. Although more increasing of pressure decreased the luciferase activity, indicating that the pressurized plasmid DNA was applicable for gene delivery.

Conclusions

It was found that the high pressurization induced the super-coiling of relaxed plasmid DNA and the compaction of super-coiled plasmid DNA. The extent of the tertiary structural changes of them was depended on the pressurizing strength and time. The high hydrostatic pressurization is considered as a potential tool for preparing the compacted plasmid DNA.

505 電気インピーダンス法による骨格筋損傷度の評価の試み

Basic study for evaluation of skeletal muscle injury 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, Injury model, Quantitative evaluation

1. 緒言

スポーツ傷害や事故によって筋繊維や筋線維の断裂が生じた場合、骨格筋の損傷状態を調べる方法として血清クレアチンキナーゼによる生化学的検査やMRIによる画像診断が行なわれている。臨床における筋損傷の診断方法として大変有用であるが、検査・診断時間が長く煩雑な操作や熟練した技術が要求される。筋損傷から回復までの期間を短縮するためには受傷後の適切な処置が重要であり、患者のQOLの向上のために損傷した筋組織の状態を迅速かつ詳細に調べる技術が必要である。

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な電気インピーダンス法⁽¹⁾に着目した。骨格筋量の推定や患者の浮腫の診断などに用いられており、骨格筋の損傷度を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。従って本研究の目的は、骨格筋の組織構造と電気インピーダンスとの関係調べ、電気インピーダンス法の筋損傷の評価方法における有用性を検討することである。

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、酵素処理により物理化学的に構造を変化させた酵素モデルを作製した。

2-1-1. 試験片

試験片には、生後約6ヶ月、体重約100kgの食用豚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10×25×5mmの板状に成形したものを試験片とした。

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、リン酸緩衝生理食塩水(以下PBSと略す)(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調整した。

酵素溶液10ml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Control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PBSに1時間浸し十分平衡に達した後、各実験を行った。

2-2. 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。湿润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。

2-3. 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筋線維方向に対して平行になる様試験片に刺入した。電圧検出電極両端の電圧を10mVrms一定のもと、4Hzから1MHz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。

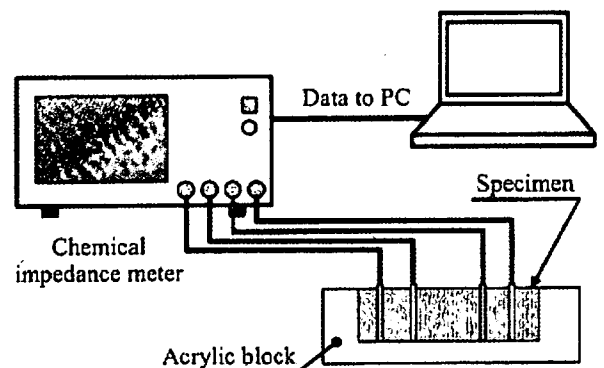


Fig.1 Diagram of measurement system for electric impedance.

2-4. 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10mm/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求め評価指標とした。

3. 結果

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

図 3 に 1 kHz 時の電気インピーダンスの測定結果を示す。Control 群に比べて Collagenase 群の電気インピーダンスは低かった。全ての測定周波数において同様の傾向が見られた。

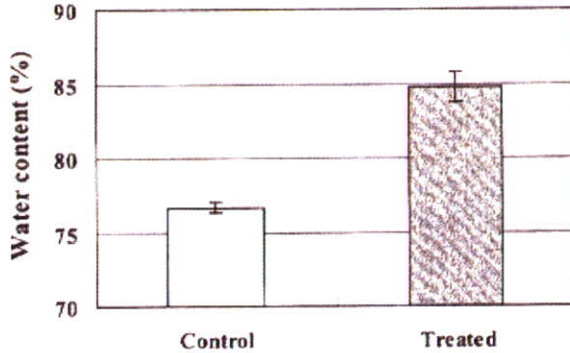


Fig.2 Results from water content measurement (Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

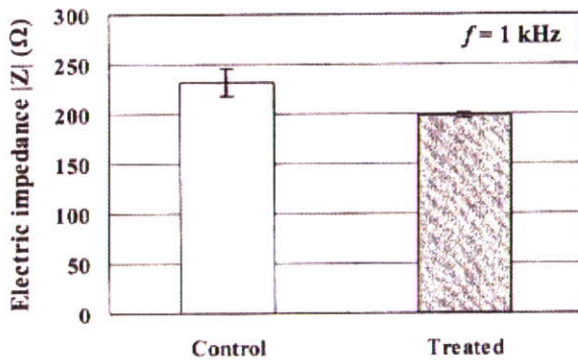


Fig.3 Results from electric impedance measurement (Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

図 4 に引張試験の結果を示す。Control 群に比べ、Collagenase 群の接線剛性は低い傾向がみられた。処理後の酵素溶液中に沈殿物が見られ、位相差顕微鏡で観察した所、分解された筋繊維が確認された (図 5)。

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。Control 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や筋線維が分解された結果、筋組織が膨潤したためだと考えられる。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^(2,3)。Control 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、Control 群に比べて Collagenase 群の接線剛性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。

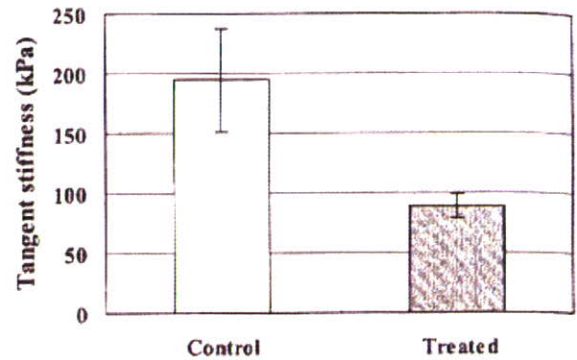


Fig.4 Results from tensile test (Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

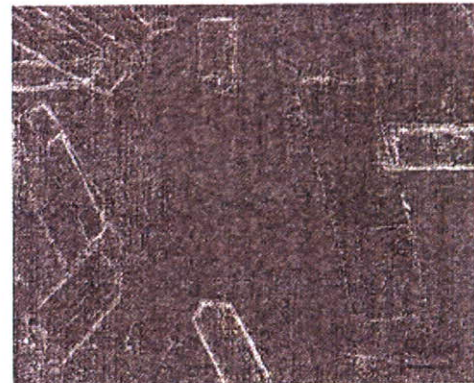


Fig.5 Phase-contrast image of digested muscle fiber.

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) 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
- (2) 近藤英雄他 3 名、電気インピーダンス法を利用した関節軟骨の力学特性の評価、第 19 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集 No.06-65、(2007)、446-447
- (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.

230 培養筋管細胞の収縮動態の定量評価

Quantitative evaluation of dynamic state of cultured myotube contraction

○ 林宏行 (阪工大院), 正 山崎健一 (阪工大院), 小林裕之 (阪工大院), 宇戸禎仁 (阪工大院),
江橋具 (国立循環器病七), 正 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)

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

Kenichi YAMASAKI, 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

Tomo EHASHI, Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center

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: C2C12, Contraction, Electrical pulse, Chronaxie, Actuator

1. 緒言

近年, 医療分野でマイクロマシンが使用されつつある。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, 小型, 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, アクチン, ミオシンの働きによ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, 我々は筋芽細胞を培養することによって作製した培養筋をアクチュエータとして利用する試みを進めている。培養筋をアクチュエータとして利用するためには, 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⁾が報告されているが, その刺激条件と筋管細胞の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刺激の大きさ, 周波数, パルス幅および筋管細胞に対する刺激の方向性について検討し, 筋管細胞収縮の動態変化を定量的に評価した。

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 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に播種した。培養液には 10% ウシ胎児血清, 抗生物質を含む High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HG-DMEM) を用い, 37°C, CO₂ 5% の環境下でコンフルエントになるまで培養した。その後, 筋芽細胞の融合を促進させるため, 培養液を 7% ウマ血清, 抗生物質を含む HG-DMEM (DM) に変更し, 引き続き培養した。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の形態を観察した。

2-2. 筋管細胞収縮の周波数応答性の評価

電気パルスに対する筋管細胞収縮の周波数応答性を調べた。図 1 に実験システムの概要図を示す。分化誘導から 6 日後に, ディッシュに白金平板電極を互いに向き合うように設置し, Waveform generator を用いて培養液中にパルス電圧を印加した。電界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。入力電圧を 20

V_{pp}, パルス幅 10 msec とし, 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収縮の動態を位相差顕微鏡画像で観察し, コンピュータに動画を取り込んだ。取り込んだ動画をフレームごとの静止画に変換し, 画像を Grayscale に変換した。収縮弛緩が見られる細胞の輪郭付近を選択し, その領域の Grayscale の平均値を求めた。さらに, Grayscale の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. 基電流およびクロナキシー測定

分化誘導から 6 日後に周波数を 1 Hz とし, 入力電圧およびパルス幅を変化させ, 筋管細胞が収縮弛緩するときのそれぞれの値を調べた。ディッシュと直列に 100 Ω の抵抗を接続し, その両端の電圧を測定することによって回路中に流れる電流を算出した。筋管細胞が収縮弛緩し始めるときの電流とパルス幅との関係 (Strength-Duration curve) を求めた後, 最小二乗法によって Weiss の近似式²⁾に近似し, 基電流とクロナキシーを求めた。実験は 37°C, 大気中で行った。また周囲溶液には 10% ウシ胎児血清, 抗生物質, 25mM HEPES を含む HG-DMEM を使用した。

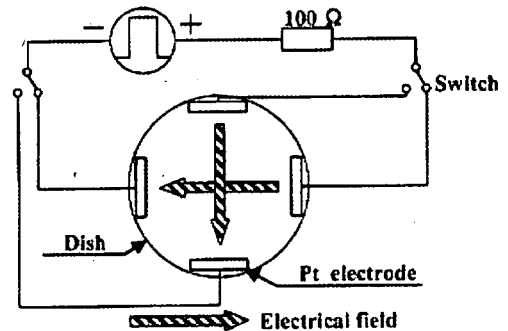


Fig.1 Schematic drawing of experimental system

3. 結果

図 2 にコンフルエント時と分化誘導から 6 日後の C2C12 細胞の位相差顕微鏡画像を示す。コンフルエントに達した後に, 培養液を DM に変更することで, 単核の筋芽細胞が細長い筋管細胞に変化している様子が観察された。

電気パルスを加えた結果、ParallelではGrayscaleの平均値が周期的に変化したが、Verticalでは周期的な変化は見られなかった。また、ここには示していないが10 Hzでは入力開始時にGrayscaleの平均値が上昇し入力停止時に減少した。図3にGrayscaleの平均値の時間変化をフーリエ変換した結果を示す。Parallelの0.5 Hz、1 Hz、3 Hzにおいて入力信号と同様の周波数でスペクトルのピークが見られた。しかし、5 Hzにおいてはピークは確認できなかった。

図4にParallelおよびVerticalの基電流およびクロナキシーの結果を示した。Parallelの基電流はVerticalに比べて有意に小さかった。またParallelのクロナキシーはVerticalに比べて小さい傾向を示していた。

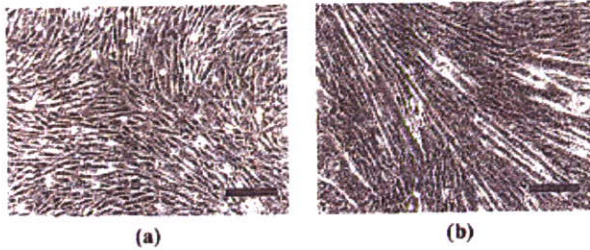


Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells.

(a) Confluence,
(b) 6 days after differentiation induction,
bar=100 μm

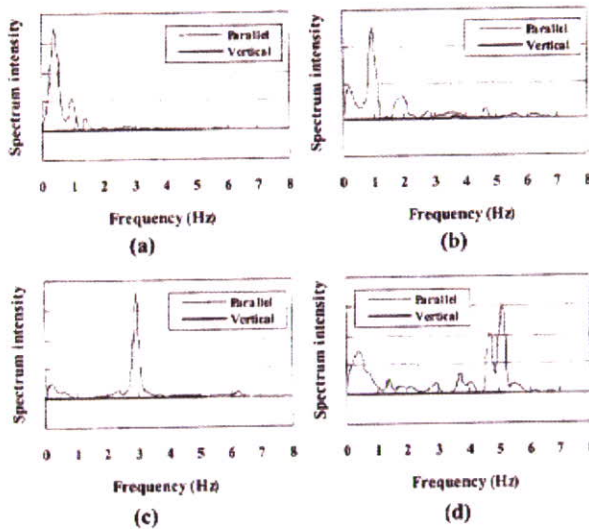


Fig.3 Results of Fourier transform .

(a) 0.5 Hz, (b) 1 Hz, (c) 3 Hz, (d) 5 Hz

4. 考察

本実験において筋管細胞の収縮は0.5 Hzから3 Hzまで周期的に変化した。フーリエ変換の結果、入力信号と同様の周波数でスペクトルのピークが見られたが、5 Hzではスペクトルのピークは確認できなかった。また10 Hzでは入力開始時にGrayscaleの平均値が上昇し入力停止時に減少した。このことより、周波数5 Hz以上では生体筋で見られる強縮が生じていたと考えられる。生体の運動においては強縮が用いられており、これにより大きな力を発生することができる。よって、培養筋をアクチュエータとして利用する場合、周波数による強縮が重要であると考えられる。

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⁽²⁾。ParallelはVerticalに比べて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の長軸に対して平行に電界を生じさせることにより、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可能であることを示唆している。

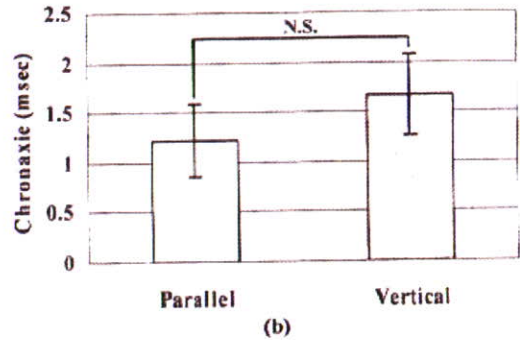
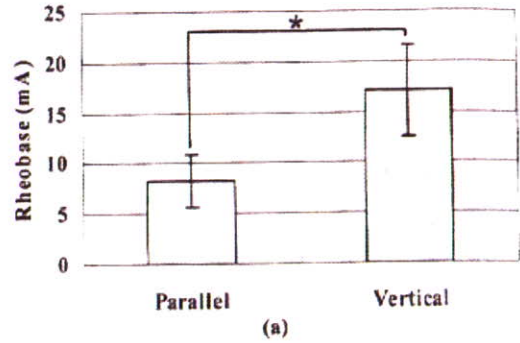


Fig.4 Results of Rheobase and Chronaxie.

(a) Rheobase ($*p < 0.01$, Parallel :n=9, Vertical:n=4),
(b) Chronaxie ($p = 0.081$, Parallel :n=9, Vertical:n=4)

5. 結言

本実験より、以下の結言を得た。

1. 電気パルス刺激の周波数により筋管細胞の収縮動態が変化することがわかった。
2. 筋管細胞には電界に対する異方性があり、筋管細胞の長軸に対して平行に電界を生じさせることにより、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」の助成により行われた。

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) L.A. Geddeset, J.D.Bourland. The Strength-Duration Curve. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering. Biol Anim.* 1985 ; BME-32 ; 6 : 458-459

325 無細胞生体由来組織を基材としたバイオアクチュエータの開発

Development of bio-actuator using acellular tissue scaffold.

○正 山崎健一 (阪工大院), 寺田堂彦 (阪工大), 学 近藤英雄 (阪工大院),
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

Dohiko TERADA, Department 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, acellular tissue, C2C12 cell, Elastin, Electrical pulse,

1. 緒言

生体筋は出力対重量比が大きく、柔軟かつ軽量のアクチュエータであることから義肢としての応用が期待される。我々は生体筋の代わりとして、培養筋をバイオアクチュエータとして利用する試みを行っている。培養筋をアクチュエータとして使用するには、外部制御可能な培養筋組織を *in vitro* で構築する必要がある。これまで *in vitro* における培養筋の再生については、コラーゲンゲル¹⁾やポリプロピレン繊維²⁾をスキャフォールドとして用いた方法やスキャフォールドを用いない方法³⁾が報告されている。しかし、ゲルやスキャフォールドを用いない方法は培養筋の大きさの制御が困難で、強度が低い問題点がある。また、ファイバーを用いた方法では培養に時間がかかるなどの問題がある。そこで、新たなスキャフォールドとして機械的強度があり、形状の制御が比較的容易な脱細胞化した生体由来組織に着目した。本研究の目的は、脱細胞化した生体由来組織を足場として筋芽細胞を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することである。

2. 実験方法

2-1. スキャフォールドの作製

本研究では無細胞生体由来組織として、脱エラスチン化したクラウン系ミニブタの大動脈を使用した。大動脈を熱架橋したのち、エラスターゼにてエラスチンを分解した。エラスターゼ処理後にエラスチン阻害剤を用いてエラスチンの活性を失活させた。その後、アルコール及びPBSにて試験片を洗浄し、脱エラスチン化生体由来組織(以下 Scaffold)を作製した。スキャフォールドを5mm×15mmの大きさに成形し、図1に示すようにポリカーボネート製のジグに直径0.7mmのキルシュナー鋼線で固定した。

2-2. 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。脱エラスチンスキャフォールド表面に濃度 1.0×10^6 cells/mlのC2C12細胞懸濁液を50 μ l播種した。培養液には10%ウシ胎児血清、抗生物質を含むHigh-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM)を用いた。2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%ウマ血清、抗生物質を含むHG-DMEMに変更し、さらに6日間培養した。培養は37°C、5%CO₂、湿度100%の環境下で行い、培養液の交換は2日毎に行った。

2-3. 培養筋収縮弛緩の周波数特性

培養8日目にパルス電圧に対する培養筋の周波数応答性を調べた。信号源としてWaveform generatorを使用し、Scaffold

を固定しているキルシュナー鋼線に電圧を印加した。パルス幅を10 msec、入力電圧を30 Vp-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。さらに取り込んだ動画をフレーム毎の静止画に分割し、Grayscale (Black: 0-White: 255)に変換した。収縮弛緩するScaffoldの一部(25 pixel×25 pixel)を選択し、その領域の平均値を求めた。さらにGrayscale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。

2-4. 組織観察

実験後のScaffoldの断面を観察するために固定および脱水した後にパラフィン包埋し、HE染色を行った。また、パラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液で固定した後に脱水および乾燥させ、走査型電子顕微鏡(SEM)でScaffold表面を観察した。

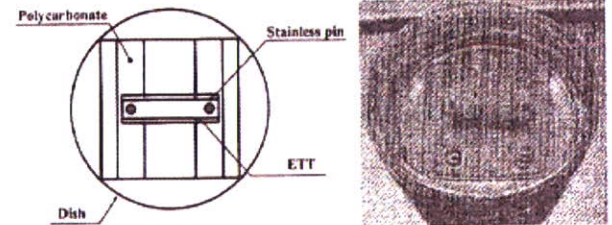


Fig.1 Fixation method of Scaffold.

3. 結果

培養8日目に電気パルス刺激を行ったところ、Scaffoldが収縮弛緩した。図2に周波数1 Hzおよび3 Hzにおける画像解析の結果を示す。1 Hzおよび3 Hzともに時間経過に伴い、Grayscaleが周期的に変化した。10 HzにおけるGrayscaleの時間変化を図3に示す。10 Hzでは、周期的なGrayscaleの変化は見られず、入力開始時にGrayscaleの平均値が上昇し、刺激の間その値が維持されていた。

図4にフーリエ変換の結果を示す。1 Hzおよび3 Hzではそれぞれの周波数において最も高いピークが見られたのに対し、10 Hzでは見られなかった。

図5にHE染色の結果を示す。ほとんどの細胞がScaffold表面に接着しており、Scaffold内部への侵入は見られなかった。

図6にSEM観察の結果を示す。細胞は細長い形態を示しており、Scaffoldの長軸と平行に配向している様子が見られた。

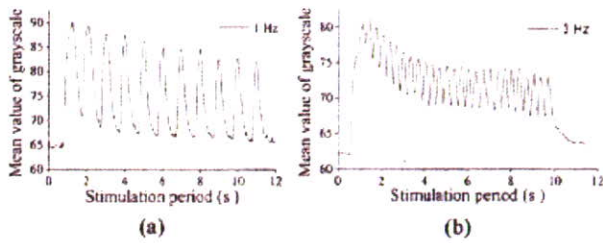


Fig.2 Time-dependent variety of the Grayscale with electrical pulse. (a) 1 Hz, (b) 3 Hz

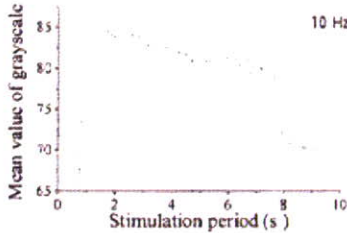


Fig.3 Time-dependent variety of the Grayscale with electrical pulse at 10 Hz.

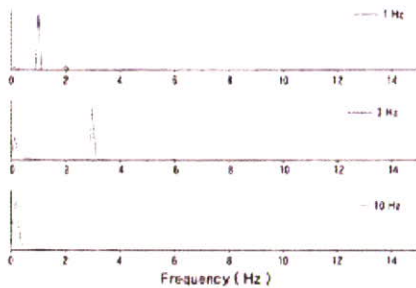


Fig.4 Result of Fourier transform.

4. 考察

外部からの電気パルス刺激によって筋管細胞や培養筋組織が収縮することに関するいくつかの報告がなされている。本研究においても、電気パルス刺激により Scaffold が収縮弛緩する様子が見られた。Grayscale の平均値をフーリエ変換した結果、1 Hz および 3 Hz において電気パルスの周波数と同様の周波数に最大ピークが見られたことから、Scaffold はパルス電気刺激と同期して収縮弛緩していることがわかる。一方、10 Hz の電気パルスを印加した場合には、10 Hz に最大ピークが見られなかった。しかし、図 3 に示すように電気パルス入力開始時に Grayscale の平均値が上昇し、刺激の間維持されていた。今回用いた Grayscale の平均値は Scaffold の動きを示しており、10 Hz では電気パルス刺激により収縮し、刺激の間その状態を維持していることを示している。これらのことから、周波数 10 Hz では Scaffold の強縮が生じていたと考えられる。

SEM 観察の結果、細胞が Scaffold の長軸方向に配向する様子が見られた。ここには示していないが、Scaffold 両端を固定せずに本研究と同様の方法で培養した場合、培養に伴って Scaffold が縮む様子が観察された。このことから、Scaffold の収縮を固定によって妨げたため、Scaffold 表面の細胞に負荷が加わり、一方向に配向したと考えられる。

組織観察の結果、細胞は Scaffold 表面のみに接着しており、内部にはほとんど細胞が侵入しなかった。Terada⁴⁾らは Scaffold をブタの大動脈に移植して 1 ヶ月後に取り出した際、細胞が十分に Scaffold 内部まで侵入していたと報告している。このことから、Scaffold は内部に細胞が侵入しうる空間を有していると考えられる。このことから、細胞を内部まで侵入させる方法について検討していく必要があると考えられる。さらに、培養筋をアクチュエータとして利用するには、その収縮力や変位量を測定する必要があるため、今後それらを測定していく予定である。

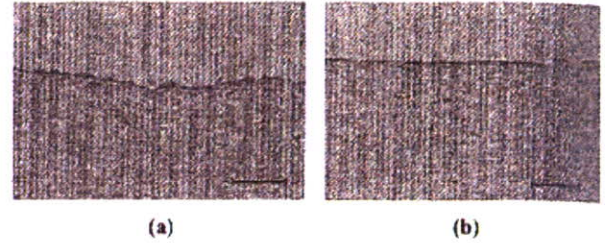


Fig.5 Histological stain of Scaffold (HE stain). (a) Transverse section (b) Longitudinal section

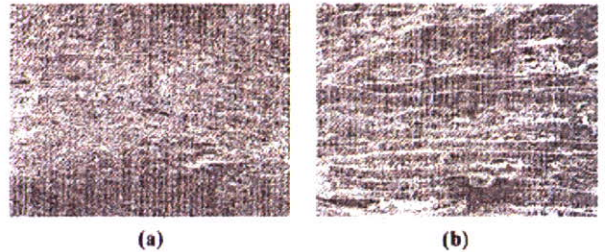


Fig.6 SEM image of the Scaffold surface. (a) X100 (b) X500

5. 結論

本実験より以下の結論を得た。

1. C2C12 を播種した Scaffold は電気パルスにより収縮弛緩し、周波数により Scaffold の収縮弛緩動態が変化することが示された。
2. Scaffold を固定して培養すると、その長軸方向に筋管細胞が配向することが示された。

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) T Okano et al.: Tissue engineered skeletal muscle: Preparation of highly dense, highly oriented hybrid muscular tissue, Cell Transplantation 1998: Vol. 7, No. 1: 71-82.
- (2) T. Neumann et al.: Tissue engineering of skeletal muscle using polymer fiber arrays, Tissue Engineering 2003: Vol. 9, No 5: 995-1003
- (3) R. G. Dennis et al.: Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered in vitro, In Vitro cell. Dev. Biol. 2000: Vol 36: 327-335.
- (4) D. Terada et al.: Development of the regenerative vascular graft having an in vivo repopulationality, Tissue engineering 2007: Vol. 13, No 7: 1673.

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@bmc.oit.ac.jp

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF DECELLULARIZED PORCINE CORNEA FOR THE CORNEAL TISSUE ENGINEERING

Kishida A¹, Kimura T¹, Funamoto S-I¹, Hashimoto Y¹, Sasak Si², Mochizuki M², Kobayashi H³, Fujisato T⁴

¹ Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

² Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University

³ Biomaterials Center, National Institute for Materials Science

⁴ Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

INTRODUCTORY REMARKS: Corneal transplantation is one of the most effective treatment for serious corneal diseases, however, shortage of supply (except USA), rejection and inflammatory reaction are serious problems. We have been studying the preparation of the biological scaffold using ultra-high pressure to develop a novel tissue engineering. In the present study, we studied the preparation and characterization of decellularized cornea.

MATERIALS AND METHODS: Porcine corneas were pressurized at 4,000 to 10,000 atm at 10 or 30 °C for 10 min, and then washed by culture medium containing DNase I, antibiotics for 72 hours to remove the cellular components (UHP method). The characterization of the decellularized cornea were done by histological study (H-E staining), transparency measurement, and mechanical strength measurement.

RESULTS: UHP treatment affected the transparency of cornea. The transparency of cornea was decreased under the higher pressure and temperature condition, however, the transparency of the decellularized cornea was recovered by the immersion of them in glycerol. It shows that the superstructure of collagen fibrils was well maintained after UHP treatment. In other decellularized methods (detergent treatment), cornea was swelled, dissolved and damaged in all cases. By histological study, the complete removal of epithelial and stromal cells was confirmed in all of the pressurized corneas. Pilot study of implantation of the decellularized porcine cornea into rabbit eye showed an excellent recovery of transparency and very low inflammatory responses.

DISCUSSION: Only the UHP treatment could give the decellularized cornea. UHP treatment is also known as a sterilizing method, so the UHP method is one of the ideal decellularizing methods. It will be suggested that the decellularized porcine cornea by UHP method would be useful as corneal scaffold for corneal tissue regeneration.

PRESENTED BY:

Akio Kishida, Prof. Ph.D.
Department of Functional Molecules
Institute of Biomaterials and Bioengineering
Tokyo Medical and Dental University
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku,
Tokyo 101-0062, Japan

Phone: 81-3-5280-8028
Email: kishida.fm@tmd.ac.jp

一般演題13

異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発

大阪工業大学1)、国立循環器病センター2)、東京医科歯科大学3)、物質材料研究機構4)

○藤里俊哉1)、寺田堂彦1)、湊谷謙司2)、山崎健一1)、林 宏行1)、江橋 具2)、小林尚俊4)、岸田晶夫3)、山岡哲二2)、中谷武嗣2)、北村惣一郎2)

われわれは、異種組織から細胞成分等を除去し、マトリックス成分のみが残存した多孔質構造体を組織再生のテンプレートとして用いる再生医療技術を開発している。移植後に自己組織化され、患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。血管、心臓弁の他、角膜や筋肉、神経、皮膚等のテンプレート作成について報告する。

ミニブタやラットから各種組織を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた980MPaの超高压印加による細胞破壊処理、及び残渣成分の洗浄除去処理を行うことで細胞成分を除去した。血管、心臓弁では、組織内のエラスチン線維も酵素によって除去した。得られたテンプレートを、同種あるいは異種動物に同所性に移植した。また、テンプレートへの細胞組み込みについても検討した。

下行大動脈の同種移植では、移植12ヶ月後に移植時の約1.5～2倍の大きさとなり、グラフト前後の血管と完全に一体化していた。内腔は内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋及び線維芽細胞の浸潤を認めた。角膜実質部ミニブタ組織のウサギへの異種移植では、軽微な炎症反応を認めたものの、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。筋組織では、筋芽細胞を播種した後で筋管細胞へと分化させることによって、生体外で電気刺激にて収縮挙動を示すことを確認した。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、科学技術振興調整費、及び文部科学省学術フロンティア事業の補助を受けて実施された。

生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生

大阪工業大学、国立循環器病センター1)、東京医科歯科大学2)、物質材料研究機構3)

○藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司1)、山崎健一、林 宏行)、近藤英雄、江橋 具1)
小林尚俊3)、岸田晶夫2)、山岡哲二1)、中谷武嗣1)、北村惣一郎1)

われわれは、生物由来素材を臓組織再生用のスキャフォールドとして用いる再生医療技術を開発している。プラスチックや金属などとは異なり、本スキャフォールドは移植後にリモデリングされることによって、患者の成長に伴う臓組織の成長が期待できる。本報告では、血管、心臓弁、筋肉、角膜、皮膚等のスキャフォールド作成と、その細胞ハイブリッド化について述べる。

ミニブタやラットから各種組織を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた980MPaの超高圧印加による細胞破壊処理、及び残渣成分の洗浄除去処理を行うことで生物由来素材スキャフォールドを作成した。さらに、血管、心臓弁では、組織内のエラスチン線維も酵素によって除去した。また、市販のコラーゲン溶液から再構成したコラーゲン多孔質体もスキャフォールドとした。スキャフォールドの細胞ハイブリッド化は、回転培養法を用いた表面播種の他、組織内への細胞注入も検討した。

血管、心臓弁では細胞ハイブリッド化せずにスキャフォールドのみの同種移植を行ったところ、移植12ヶ月後に移植時の約1.5~2倍の大きさとなり、スキャフォールド前後の血管と完全に一体化していた。内腔は内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋及び線維芽細胞の浸潤を認めた。角膜実質部ミニブタ組織のウサギへの異種移植では、軽微な炎症反応を認めたものの、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。筋組織では、筋芽細胞をハイブリッド化した後で筋管細胞へと分化させると、生体外で電気刺激に応じた収縮挙動を示し、その収縮力を測定することができた。スキャフォールド内部への細胞ハイブリッド化方法として、薬物インジェクタを使用したところ、スキャフォールド内へ注入された細胞の生着が認められた。

生物由来素材スキャフォールドは、種々の臓組織再生のための基材として有効であると考えられる。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、科学技術振興調整費、及び文部科学省学術フロンティア事業の補助を受けて実施された。

P-085 脱細胞化角膜の組織適合性評価

橋本 良秀¹, 松本 誠一², 佐々木秀次³, 望月 學⁴,
 藤里 俊哉¹, 木村 剛⁵, 小林 尚俊⁶, 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大阪工業大学医工学研究センター

【背景・目的】従来、代替角膜として高分子材料を用いた人工角膜の開発が行われているが、生体物性などの相違から接合部での融解に伴う脱落が報告されている。近年、角膜再生において再生医療技術の有効性が示され、角膜全層の再生が期待されている。しかしながら、角膜の約90%を占める実質部の再生には至っていない。我々は、角膜実質部として生体より細胞を除去した脱細胞化角膜の開発と有効性を検討している。本研究では、脱細胞化角膜の組織適合性について検討したので報告する。

【方法】成体ブタ眼球から角膜を採取した。超高压印加装置を用いた10,000気圧の超高压印加による細胞破壊、及び振盪洗浄による細胞残渣除去を行った。脱細胞化を組織学的観察、残存DNA、GAG定量により評価した。また、示差走査熱量分析、電子顕微鏡観察により組織の微細構造変化を検討した。日本白色家兎の左眼角膜にポケットを作製し、未処理角膜移植群、脱細胞化角膜移植群に分け、透明性、炎症反応など比較検討を行った。

【結果・考察】超高压処理した角膜では、完全な細胞除去が達成され、コラーゲン線維の徑向も維持されていた。ウサギへの異種移植において、未処理角膜では新生血管が多数観察され、拒絶反応が惹起された。一方、脱細胞化角膜では、軽微な炎症反応を認めしたが、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。以上より脱細胞化角膜の移植用角膜としての有用性が示唆された。

P-165 力学特性の制御を目指した脱細胞化血管の調製

村越 彩子¹, 木村 剛¹, 船本 誠一¹, 藤里 俊哉¹, 岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所分子制御分野, ²大阪工業大学医工学研究センター

【緒言】

我々は、バイオスキャフォールドの調製法として、圧力印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣等を除去する超高静水圧処理法を考案し、脱細胞化組織の調製を検討している。これまでの移植試験では、早期の内皮化、及び、内腔肥厚抑制を報告した。また、脱細胞化血管調製時における圧力印加条件により、ECM線維間の空隙を変化できることを報告した。これは、力学特性と細胞浸潤性を変化させると考えられ、本研究では、移植材料として重要な力学特性について検討した。

【方法】

成体ブタの大動脈から10mm×15mmの血管試料を調製した。冷間等方圧加圧装置（株）神戸製鋼所）を用いて、様々な初期温度、変圧速度、圧力印加時間にて10000気圧の超高静水圧を印加した。組成の異なる洗浄液による所定の時間の浸透洗浄により細胞残渣等を除去した。処理標本の組織断面を顕微鏡観察、透過型電顕観察にて細胞除去、組織構造を評価した。力学試験にて、超高圧処理による力学特性の変化を評価した。

【結果・考察】

超高圧処理を用いた脱細胞化処理は、圧力印加条件（初期温度、昇圧・保持・減圧時間）の異なる条件で超高静水圧を印加し、所定期間にて洗浄を行った。圧力印加条件によらず、完全な脱細胞化処理がなされた。力学特性は、条件に依存して変化した。超高圧印加条件を調製することで、特に弾性率の異なる血管組織スキャフォールドの調製ができることが示唆された。

P-167 血管組織の新規脱細胞化処理法の検討

玉井 克明¹, 藤里 俊哉², 岸田 晶夫³, 山岡 哲二¹

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大阪工業大学, ³東京医科歯科大学

【緒言】脱細胞化組織を用いた再生型移植では、移植後にレシピエントの細胞が浸潤することで、自己修復の機転や患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。我々は、超高圧脱細胞化処理法を開発し、動物実験によってその有効性を検討してきた。本法においては、超高圧印加処理後に、PBSをベースとする洗浄液で細胞残渣を取り除くことで良好な脱細胞化が可能であることを明らかにしてきた。今回、さらなる、細胞除去方法の隔離を目指し、新たな洗浄方法を模索した。【方法】実験動物としてLewis rat(donor用), SD rat(recipient用)を使用した。ラット下行大動脈を採取し、超高圧印加処理を施した。処理を施した血管を、PBSや培地による処理の他、生体分子と接触させる等の手法により細胞除去を促進した。所定時間処理後、脱細胞化度合いをDNA定量および組織学的に検討した。【結果】本処理工程の最適化により、超高圧印加処理後の組織から脱核が完全に達成できていた。また、細胞残渣を従来の洗浄液で取り除いたものより、血管構造が保持されていることから、その強度を検討するとともに、現在、DNA定量により定量的評価を進めている。さらに、超高圧処理を施していないnative血管についても同様の処理による脱細胞化効率の検討を進めている。

P-166 脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生

寺田 堂彦¹, 澤田 和也¹, 緒方 裕之¹, 平工 香織¹, 鎌田和加子¹, 吉田 謙一¹, 船本 誠一², 藤里 俊哉¹, 岸田 晶夫³, 山岡 哲二¹, 中谷 武嗣¹

¹大阪工業大学工学部生体医工学科, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³大阪成蹊短期大学, ⁴国立循環器病センター, ⁵東京医科歯科大学

現在、臨床においては年間約5万本もの人工血管が使用されている。しかしながら、成長機能の欠如から小児患者への適用には問題が残されており、再生型人工血管の開発が依然として望まれている。我々は再生型人工血管の開発を目的とし、ブタ大動脈組織を由来とするバイオスキャフォールドに関する研究を行った。血管組織試料としてブタ大動脈（ジャパンファーム）を用いた。120度C、24時間の熱脱水管架橋を施した血管組織に対し、エラスターゼ/トリス緩衝液（0.57 μg/ml CaCl₂ 10 mM Na₃ 0.02%; pH 8.37度C）中で72時間振盪処理を行い、エラスチンを分解除去した。その後、エタノール(80 v%) 37度C: 72時間) 処理によってリン脂質を抽出除去した。作製した脱エラスチン化動脈組織を用いて同種ミニブタへの置換移植実験を行った結果、移植期間3ヶ月の時点でグラフトに瘤化および石灰化は認められず、無数のレシピエント由来平滑筋細胞の浸潤が確認された。6ヶ月ではグラフト内にわずかに石灰化が認められた。MTC染色では、6ヶ月でエラスチン線維の再形成は認められなかった。弾性線維の豊富な動脈組織の再生には、さらに長期経過の観察が必要であると考えられる。本方法により作製されたグラフトは再細胞化能と石灰化抑制効果を有しており、再生型バイオスキャフォールドとしての有効性が示された。

P-186 電気インピーダンス法を用いた培養筋成熟度の評価の試み

北 孝之¹, 近藤 英雄², 寺田 堂彦², 山崎 健一², 橋本 成広³, 藤里 俊哉²¹大阪工業大学工学部電子情報通信工学科, ²大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ³ヒューマンサイエンス振興財団

【緒言】患者のQOLの向上のために再生医療技術を応用した培養筋に関する研究が活発に行われているが、培養過程に伴う培養筋の成熟度を非破壊的に評価する方法は確立されていない。そこで我々は体脂肪率の測定などに用いられている電気インピーダンス法に着目し、培養筋成熟度の定量評価方法としての有用性を検討するため、骨格筋の構造の変化と電気インピーダンスとの関係を探った。

【実験方法】組織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、生後約6ヶ月、体重約100 kgの食用豚大腰筋より採取した骨格筋を試験片とし、コラゲナーゼ処理を施した酵素処理群と未処理の対象群を準備した。電気インピーダンス測定はケミカルインピーダンスメータを使用した。測定は空气中、室温環境下で行い、得られたデータをPCに保存後、解析を行った。電気インピーダンス測定後、試験片の含水率を調べた。また、万能試験機を用いて引張試験を行い、試験片の力学的強度を評価した。

【結果および考察】対象群に比べて酵素処理群の含水率は高く、電気インピーダンスは低い傾向が見られた。引張試験を行った結果、対象群に比べて酵素処理群の接線剛性は低い傾向が見られた。これらのことから電気インピーダンス法を用いて水分状態を調べることにより骨格筋の構造の変化を推定することが可能であり、培養筋成熟度の評価方法として有用であることが示唆された。

P-187 ポリプロピレン繊維-コラーゲンゲル複合体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², 澤田 和也¹, 近藤 英雄¹, 橋本 成広³, 藤里 俊哉¹¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³大阪成蹊短期大学総合生活学科

【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として使用するためには、筋組織と同様に筋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。そこで、培養筋を作製するためのスキヤフォールドとして繊維-ゲル複合体に着目した。繊維-ゲル複合体は繊維そのものが強度を有しており、ある程度大きさを制御することが可能である。さらに、繊維に沿って細胞が配向すると期待される。これらのことから、本研究では繊維-ゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養を行い、スキヤフォールドとしての有用性を評価した。【方法】繊維にはポリプロピレン繊維を用いた。繊維を等間隔に配列させ、その上にコラーゲンゲルを形成した。マウス横紋筋由来の株化細胞であるC2C12細胞を播種し、10%ウシ胎児血清と抗生物質を含むHG-DMEMで培養した。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。【結果および考察】スキヤフォールド上で細胞が増殖し、筋芽細胞に分化している様子が見られた。入力電圧30 Vp-p, 周波数1 Hz, パルス幅10 msecの電気パルスを培養液中に印加したところ、培養筋が周波数に同期して収縮する様子が観察された。電気パルスによって収縮弛緩したことから、繊維-ゲル複合体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。

P-188 脱エラスチン組織-コラーゲンゲル複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養

山崎 健一, 寺田 堂彦, 奈良 雅尚, 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】我々はこれまで、脱エラスチン化生体組織を用いて、筋芽細胞を培養してきた。脱エラスチン化生体組織は形状の制御が比較的容易で、強度がコラーゲンゲルに比べて高いという利点がある。しかし、培養筋を占める細胞外基質量が多く、筋の収縮を妨げることが危惧される。一方、コラーゲンゲルは細胞外基質の割合が脱エラスチン化生体組織に比べて少ないが、強度が弱いなどの欠点がある。そこで、互いの利点を生かすために、脱エラスチン化生体組織-コラーゲンゲル複合体を作製し、培養筋としての機能を評価した。【方法】脱エラスチン化生体組織として、ブタの大動脈を使用した。脱エラスチン化生体組織をキルシュナー鋼線に固定し、2つの脱エラスチン化生体組織の間にC2C12細胞を包埋したコラーゲンゲルを形成した。10%牛胎児血清を含むDMEMで3日間培養した後、C2C12細胞の分化を促進させるため7%馬血清を含むDMEMで6日間培養した。培養後、電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮弛緩動態を観察した。【結果】培養9日後、ゲルが脱エラスチン生体組織を覆うように収縮した。電気パルス刺激を与えたところ、培養筋が周期的に収縮弛緩した。【結論】今回用いた複合体scaffoldは培養筋の足場として有用であることが示唆された。今後は強度や収縮力を脱エラスチン生体組織のみの場合と比較して、詳しく検討する予定である。

P-189 骨格筋培養のための機械刺激負荷装置の開発

赤土 和也¹, 山崎 健一², 出谷 耕¹, 中尾 誠¹, 吉浦 昌彦², 藤里 俊哉¹, 筒井 博司²¹大阪工業大学大学院工学研究科機械工学専攻, ²大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ³大阪工業大学工学部機械工学科

【目的】骨格筋をアクチュエータとしてとらえるならば, 人工的なアクチュエータでは得られないフレキシビリティと高効率なエネルギー変換が可能になる。骨格筋は, 多くの筋細胞が融合した筋繊維の束から成り, 大きな収縮力を発揮する。そこで, 筋芽細胞から培養をスタートし, 機械刺激負荷による細胞の配向性について評価した。

【方法】筋芽細胞を包埋したコラーゲンゲルに機械刺激を負荷する装置を作製した。刺激駆動部には圧電バイモルフを使用し, 印加する電圧の波形を制御することで, 任意の刺激を負荷することを可能とした。C2C12細胞を包埋したゲルは全長12mmであり, 均培培地から分化培地に変えた4日目から7日間, 機械刺激を負荷した。圧電バイモルフの印加電圧波形は, 0.5Hzの台形波を印加し, ゲルに12[mN]の荷重で伸縮と弛緩を繰り返す動きを負荷して培養した。装置上でゲル包埋し負荷せずに培養したものをcontrolとした。

【結果】HE染色の結果, 機械刺激を負荷したことにより, 骨格筋細胞が刺激方向に配向した。また, パルス電圧負荷により, 培養筋が収縮弛緩した。一方, controlの方では, 配向は見られなかった。

【結論】機械刺激を与えることは, 骨格筋細胞の配向性を与えることにおいて有効であることが示唆された。(本研究は, 文部科学省学術フロンティア推進事業「培養筋の医工学応用」のプロジェクトの一環として遂行された。)

P-191 細胞への電気刺激を目的とした電位分布の測定

西山 慶子¹, 川北 悠介², 林 宏行¹, 山崎 健一², 宇戸 慎仁², 近藤 英雄², 橋本 成広², 藤里 俊哉¹¹大阪工業大学工学部電子情報通工学科, ²大阪工業大学大学院工学研究科電気電子工学専攻, ³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, 体内で絶えず電気的刺激を受けていることから, 筋細胞の培養や培養筋の維持には電気的刺激が必要であると考えられる。電気刺激を与えながら細胞を培養する際, 外部から電圧を入力した時の培養液中および培養組織中を流れる電流の大きさ, 波形および方向を明確にしておく必要があると考えられる。本研究では2次元培養を想定し, 電圧を印加したときの培養液中の電位分布を測定した。【方法】実験には60mmコラーゲンコートディッシュを使用した。大きさ4mm×17mmの白金平板を互いに向かい合うように培養液中に設置した。培養液にはHEPES, 10%FBSおよび抗生物質を含むDMEMを用いた。先端1μmのガラス管内に白金線を挿入し, KClでガラス管内を没した電極を測定電極として用いた。白金板を介して培養液中に大きさ10V, パルス幅10 msec, 周波数1 Hzのパルス電圧を印加し, ガラス電極で負極に対する培養液中の電位を測定した。【結果】白金平板電極間においては, 陽極から陰極に進むにつれ, 電位が低下し, その低下傾向は電極からの距離と線形関係であった。また, 電極範囲内においても, 電極中央部と端部では電位の低下傾向に違いが見られた。【結論】2次元培養において, 細胞に電流刺激する場合, 電極の形状が刺激条件に大きく影響することがわかり, 実験では電極中央の細胞の挙動を調べる必要があることが示唆された。

P-190 電界に対する培養筋管細胞の異方性

林 宏行¹, 山崎 健一¹, 小林 裕之¹, 宇戸 慎仁², 近藤 英雄², 橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²大阪工業大学大学院工学研究科電気電子工学専攻

【緒言】我々は小型, 省電力なアクチュエータ作製を目指し, 培養した筋芽細胞から作製した培養筋をアクチュエータとして使用する試みを進めている。培養筋のアクチュエータ化のためには培養筋を構成する筋管細胞の収縮を制御する必要がある。現在, 筋管細胞の収縮を電気パルスで制御する試みが報告されているが, その刺激条件と筋管細胞の収縮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, 電気パルスの刺激の方向性について検討した。【方法】筋芽細胞としてマウス横紋筋由来株細胞C2C12を使用した。C2C12細胞を筋管細胞へ分化させた後, 培養液にパルス電圧を印加した。筋管細胞の収縮に及ぼす電界方向の影響を調べるため, 筋管細胞の長軸方向と平行(Parallel)および垂直(Vertical)に電界を加えた。周波数を1 Hzとして, パルス幅および刺激回路中に流れる電流を変化させ, 筋管細胞が収縮し始めるときの値を調べた。そしてパルス幅と電流の関係から基電流とクロナキシーを求めた。【結果および考察】Parallelのときは, Vertical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, 筋管細胞には電界に対する異方性があり, 筋管細胞と平行方向に電界を生じさせることで, 低いエネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることを示唆している。

P-211 生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の検討

近藤 英雄¹, 北 孝之², 寺田 堂彦³, 山崎 健一¹,
橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹

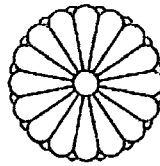
¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²大阪工業大学工学部電子情報通信工学科, ³ヒューマンサイエンス振興財団

【緒言】我々は電気インピーダンス法を用いて再生組織の成熟度を定量的に評価する試みを行っているが、生体組織の電気インピーダンスにおける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、調製が容易である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より詳細な検討を行うことを目的とした。

【実験方法】生体高分子ゲルとしてゼラチンを使用した。60℃に加熱した生理食塩水にゼラチン粉末を加え、濃度の異なるゼラチン溶液を作製した。完全に溶解したのを確認した後、自作の型に流しこみ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。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。

【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。含水率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。

特許 3



特許証
(CERTIFICATE OF PATENT)

特許第 4 0 9 2 3 9 7 号
(PATENT NUMBER)

発明の名称 (TITLE OF THE INVENTION)

超高静水圧印加による移植用生体組織の処理方法

特許権者 (PATENTEE)

大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 番 1 号

国立循環器病センター総長

発明者 (INVENTOR)

藤里 俊哉
岸田 晶夫
船本 誠一

その他別紙記載

出願番号 (APPLICATION NUMBER)

特願 2 0 0 2 - 2 6 4 4 7 0

出願年月日 (FILING DATE)

平成 1 4 年 9 月 1 0 日 (September 10, 2002)

この発明は、特許するものと確定し、特許原簿に登録されたことを証する。
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE JAPAN PATENT OFFICE.)

平成 2 0 年 3 月 1 4 日 (March 14, 2008)

特許庁長官 (COMMISSIONER, JAPAN PATENT OFFICE)

肥塚 雅博

特 許 証

(続葉 1)

(CERTIFICATE OF PATENT)

特許第4092397号(PATENT NUMBER)

特願2002-264470 (APPLICATION NUMBER)

発明者(INVENTOR)

中谷 武嗣

北村 惣一郎

[以下余白]