

**THERAPEUTIC MONITORING OF MYCOPHENOLATE MOFETILE DOSE BY TWELVE-HOUR-AREA UNDER THE CURVE TO AVOID ACUTE REJECTION IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS**

K. Wada,<sup>1</sup> T.S. Kato,<sup>2</sup> N. Oda,<sup>2</sup> I. Ochi,<sup>1</sup> Y. Maeda,<sup>1</sup> A. Mano,<sup>2</sup>

T. Kotake,<sup>1</sup> T. Nakatani,<sup>2</sup> <sup>1</sup>Department of Pharmacy, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; <sup>2</sup>Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

**Purpose:** Mycophenolate mofetile (MMF) is widely used in heart transplant recipients. Inadequate MMF dose would be a major risk factor for acute rejection or adverse effects such as bone marrow suppression, gastrointestinal disorder, and infection. However, the relationship between the serum concentration of active metabolite of MMF, mycophenolic acid (MPA) and the incidence of acute rejection, therapeutic monitoring of MMF dose by trough level (C0) or 12-Hour-Area Under the Curve (AUC0-12) is still controversial. We examined the impact of MPA C0 and AUC0-12 on acute rejection.

**Methods and Materials:** In 33 heart transplant recipients on MMF therapy, MPA C0 level and AUC0-12 were routinely measured within 24 hours from endomyocardial biopsy (EMB) or when suspecting MMF induced adverse effects. 16 patients were treated with tacrolimus (Tac)-based and 17 patients were treated with cyclosporine (CSA)-based immunosuppression.

**Results:** A total number of 186 MPA concentration measurements accompanied with EMBs were evaluated. MPA AUC0-12 were reduced when EMBs showed acute rejection (Group AR+; greater than grade 2 rejection according to the International Society of Heart and Lung Transplantation Criteria), compared with EMBs showed no or only mild rejection (Group AR-; grade 0, 1a or 1b rejection) ( $23.9 \pm 8.8$  vs.  $46.9 \pm 18.3 \mu\text{g}/\text{hr}/\text{ml}$ ,  $p < 0.005$ ). Patients with MPA AUC0-12 less than 24.1 had a significantly high risk of developing acute rejection (60% sensitivity, 94% specificity), and patients with AUC0-12 greater than 90.1 had a significantly high risk of developing adverse events (40% sensitivity, 83% specificity). MPA C0 levels were not different between Group AR- and Group AR+. The incidence of acute rejection or any adverse events were not different between Tac-based and CSA-based groups.

**Conclusions:** Therapeutic monitoring of MMF Dose by MPA AUC0-12 reflect immunosuppressive efficiency and would be useful for avoiding acute rejection and/or adverse effects induced by inadequate MMF therapy in heart transplant recipients.

459

**REDUCED SYSTOLIC STRAIN AND SYSTOLIC STRAIN RATE  
COULD DETECT SUB-CLINICAL ACUTE REJECTION IN HEART  
TRANSPLANT RECIPIENTS**

*C. Kamiya,<sup>1</sup> T.S. Kato,<sup>1</sup> N. Oda,<sup>1</sup> A. Mano,<sup>1</sup> K. Hasbimura,<sup>1</sup>  
S. Hashimoto,<sup>1</sup> K. Komamura,<sup>1</sup> M. Kitakaze,<sup>1</sup> S. Kitamura,<sup>2</sup>  
T. Nakatani,<sup>3</sup> <sup>1</sup>Department of Cardiovascular Medicine, National  
Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan; <sup>2</sup>Department of  
Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center, Suita,  
Osaka, Japan; <sup>3</sup>Department of Organ Transplantation, National  
Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan*

**Purpose:** Invasive screenings for acute rejection by endomyocardial biopsy (EMB) in heart transplant recipients are standard procedures. Strain rate imaging (SRI) derived from tissue Doppler Imaging (TDI) is sensitive in detecting sub-clinical myocardial abnormalities and could potentially detect sub-clinical acute rejection in heart transplant recipients.

**Methods and Materials:** 150 endomyocardial biopsies (EMBs) and right heart catheterization were performed in 30 transplant recipients (19 male, 11 female, 14 days to 13 years -posttransplantation). Conventional echocardiography and TDI were recorded within 12 hours of EMB performed.

**Results:** According to the International Society of Heart and Lung Transplantation Criteria, 110 EMBs (Group AR-) showed grade 0 or 1a rejection, 40 EMBs (Group AR+) showed greater than grade 1b rejection. Mean values of peak systolic strain ( $\epsilon_{sys}$ ) and systolic strain rate ( $SR_{sys}$ ) were smaller in Group AR+ compared with Group AR- ( $24 \pm 5.9$  vs.  $30 \pm 8.1\%$ ,  $p < 0.001$ ,  $2.12 \pm 0.56$  vs.  $3.17 \pm 1.18$ ,  $p < 0.01$ , respectively). Early diastolic annular velocity at mitral annulus ( $E'$ ) was smaller and the ratio of peak early transmitral filling velocity and  $E'$  ( $E/E'$ ) were greater when EMBs showed greater than grade 3a rejection (9 EMBs) compared with those of lower than grade 2 rejection (141 EMBs), but both parameters did not differ between Group AR+ and Group AR-. Hemodynamic parameters were not significantly different between the groups.

PS1-1-5

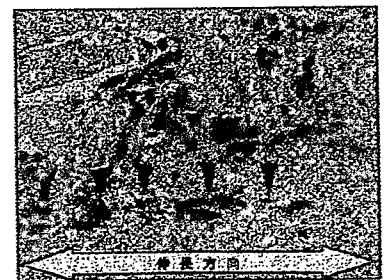
**脱細胞化筋スキヤフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導**

江橋 具<sup>1)</sup>、永谷憲歳<sup>1)</sup>、橋本成広<sup>2)</sup>、藤里俊哉<sup>1)</sup>

1) 国立循環器病センター 研究所 再生医療部, 2) 大阪工業大学

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

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



伸長培養により間葉系幹細胞が筋細胞様の形態を示した

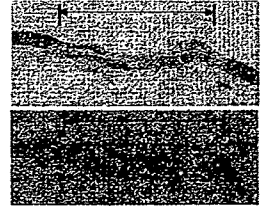
PS2-4-5

### 生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発

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

(1.医療機器センター・2.国立循環器病センター・3.大阪成蹊短期大学・4.先端医療振興財団・5.東京医科歯科大学)

大動脈組織のように、主に細胞外マトリックスから成る組織を再生させるためには、細胞の足場となるスキャフォールドが必要不可欠である。我々は、生体適合性、解剖学的類似性など種々の利点から、生体組織由来のバイオスキャフォールドを開発している。本研究では、生体組織から細胞成分や移植後の石灰化の要因として挙げられているエラスチンを取り除き、コラーゲンのみを残存させたバイオ血管スキャフォールドについて検討した。ミニプタ大動脈から架橋および酵素処理によって作成したバイオスキャフォールドを同種同所性に移植し、自己組織化および石灰化を評価した。移植後3ヶ月には、スキャフォールド内部の大部分はレシピエント細胞によって再細胞化されており、石灰化も全く認めなかったことから、再生型バイオ人工血管としての有効性が示唆された。



ミニプタ下行大動脈置換移植3ヶ月後のスキャフォールド断面組織染色写真  
上)  $\alpha$ -SMA免疫染色 下) kossa染色

## 生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発

医療機器センター ○寺田堂彦、大阪成蹊短大 澤田和也

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

## &lt;緒言&gt;

現在、臨床において人工血管は年間約5万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小児患者では成長性を得られないため、再生型人工血管の開発が望まれる。大動脈組織のように、主に細胞外マトリックスから成る組織を再生させるためには、自己組織がある程度再生されるまでの間、力学的負荷に耐え得る細胞の足場（スキヤフォールド）が必要となる。我々は、生体適合性、解剖学的類似性など種々の利点から、生体組織由来のバイオスキヤフォールドの開発を行っている。本研究では、生体組織から細胞成分や移植後の石灰化の要因として挙げられているエラスチンを取り除き、コラーゲンのみを残存させたバイオ血管スキヤフォールドを作製し、大動物実験においてその有効性の検討を行った。

## &lt;実験&gt;

熱架橋によって固定化処理を施したブタ大動脈（株）ジャパンファーム）を、エタスターゼ（エラスチン分解酵素）のトリスバッファー溶液中に浸漬することで、血管組織からエラスチンを分解除去した。さらにアルコール処理によって細胞膜成分であるリン脂質の抽出除去を行った。作製したバイオスキヤフォールドを同種同所性に移植し、組織染色および免疫染色により自己組織化の評価を行った。

## &lt;結果・考察&gt;

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

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

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

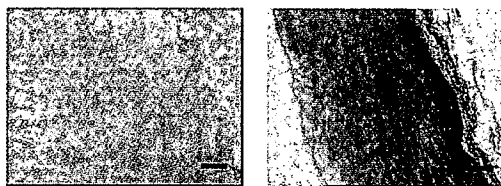


Fig.1 The cross-section of treated vascular grafts. Left, H.E. staining; Right, EVG staining. The bars in the pictures are corresponding to 200  $\mu$ m.

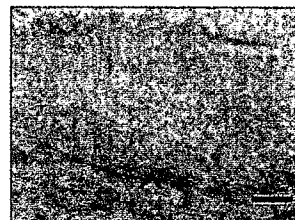


Fig.2 The cross-section of the explanted graft after 3 months of the implantation. The bar in the figure is corresponding to 200  $\mu$ m.

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

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

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

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

## ポリ乳酸ナノファイバーの生体適合性

(1 東大院農生命、2 理研・前田バイオ工学、3 マレーシア科学大、

4 国立循環器病センター研究所、5 理研・高分子化学)

○石井大輔<sup>1,5</sup>、タン フィイン<sup>2,3</sup>、馬原 淳<sup>4</sup>、村上 直<sup>4</sup>、山岡哲二<sup>4</sup>、岩田 忠久<sup>1,5</sup>

**緒言** ポリ乳酸は、トウモロコシ等の再生可能資源を原料として生産される循環型高分子であり、その優れた生体適合性と生体内分解性を活かして、手術用縫合糸やインプラント等の医用材料に応用されてきた。特に近年では、ナノファイバー化による不織布や多孔質材料としての応用も試みられている。しかしながら、ポリ乳酸は加水分解による物性低下を引き起こしやすいという問題を抱えており、これを解決する方法として PLLA と PDLA を混合する事によるステレオコンプレックス化が検討されている。本研究では、PLLA ナノファイバーおよびステレオコンプレックスポリ乳酸ナノファイバーをラット皮下に埋入し、生体内における構造及び物性変化を検討した。また、リン酸緩衝液中、37℃におけるナノファイバーの非酵素的加水分解試験を行い、ラット体内におけるナノファイバーの変化との比較検討を行った。

**実験** 1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) を溶媒として PLLA ( $M_w = 6.2 \times 10^5$ ,  $M_w/M_n=2.1$ ) および PDLA ( $M_w = 3.3 \times 10^5$ ,  $M_w/M_n=1.5$ ) の 1wt% 溶液をそれぞれ作製し、両者を等量混合することにより紡糸液を作製した。ナノファイバー作製にはフューエンス社製の Esprayer ES-2000 を用い、印加電圧 15kV、電極間距離 15cm、溶液の押出速度 40 $\mu$ l/min の条件下で作製を行った。作製したナノファイバーは 100℃で 8 時間熱処理を行った。このナノファイバーをエチレンオキサイド滅菌の後、ウイスター種 12 週齢の雄ラットの背中皮下に埋入し、約 4 週間経過後取り出して、ヘマトキシリン染色による組織切片観察、SEM 観察、X 線回折測定、引張試験、GPC 測定を行った。非酵素的加水分解試験はナノファイバーを 37℃の下リン酸緩衝液中に 4 週間静置することで実施した。

**結果と考察**

ラット皮下 4 週間埋入前後の PLLA およびステレオコンプレックスナノファイバーの GPC 測定の結果を Table 1 に示す。重量平均分子量及び多分散度共に大きな変化は見られなかった。その一方、SEM 観察および組織切片観察からは、埋入に伴いナノファイバー単繊維の切断やナノファイバーマット界面での周囲組織反応がみられたことから、ナノファイバー全体で均一に分解は進行せず、むしろ局所的に分子鎖が加水分解を受けていると考えられる。

Table 1. Molecular weight and polydispersity of PLLA and PLA stereocomplex nanofibers.

	PLLA	stereocomplex
Before implantation	$M_w = 8.4 \times 10^5$ $M_w / M_n = 1.8$	$M_w = 2.9 \times 10^5$ $M_w / M_n = 3.3$
After 4-week implantation	$M_w = 7.2 \times 10^5$ $M_w / M_n = 2.2$	$M_w = 2.5 \times 10^5$ $M_w / M_n = 2.5$

**Biocompatibility Evaluation of Poly(lactic acid) Nanofibers**

Daisuke Ishii<sup>1,5</sup>, Hui Ying Tang<sup>2,3</sup>, Atsushi Mahara<sup>4</sup>, Sunao Murakami<sup>4</sup>, Tetsuji Yamaoka<sup>4</sup> and Tadahisa Iwata<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup> Polymer Chemistry Laboratory, RIKEN Institute, 2-1 Hirosawa, Wako shi, Saitama 351-0198, Japan <sup>2</sup>Bioengineering Laboratory, RIKEN Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Satiama, Japan <sup>3</sup>Malaysia Science University, 11800 Penang, Malaysia <sup>4</sup>Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan <sup>5</sup>Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Tokyo 113-8657, Japan)

<sup>1</sup>Tel: +81-3-5841-7888, Fax: +81-3-5841-1304, E-mail: atiwata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

**Keywords** : poly(lactic acid), nanofiber, biocompatibility

**Abstract**: PLLA and stereocomplexed PLA nanofibers were electrospun from the solution in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. Biocompatibility of these nanofibers were evaluated by subcutaneous implantation of nanofibers using rat model and nonenzymatic degradation in phosphate buffer at 37 °C for 4 weeks. Characterization of nanofibers were performed by GPC, SEM, wide-angle X-ray diffraction, and optical microscopy of hematoxylin-stained ultrathin sections.

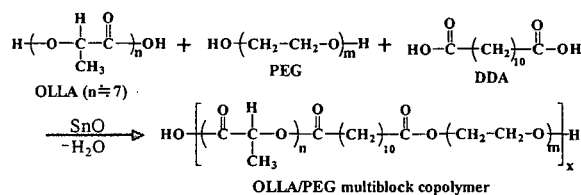
## 血管再生用スキャフォールドに対する組織反応の解析と制御

<sup>1,2</sup>岡田 康彰、<sup>2,3</sup>大矢 裕一、<sup>2,3</sup>大内 辰郎、<sup>1</sup>馬原 淳、<sup>○1</sup>山岡 哲二

<sup>1</sup>国循セ研、<sup>2</sup>関西大工、<sup>3</sup>関西大 HRC

<緒言> 体吸収性多孔質スキャホールドを用いた血管再生療法は、組織の自己化と再生組織の成長性が期待できるために、小児領域での静脈系を対象にした臨床研究が進んでいる<sup>1)</sup>。今後、動脈系への展開を図るためには、柔軟かつ高強度のスキャホールドを開発し、その信頼性の向上を図る必要がある。そのためには、スキャホールド材料特性のみでなく、その成形加工方法の改良、さらには、自己組織化過程の検証が必要である。そこで本研究では、従来のポリ乳酸(PLLA)、および、我々が検討を進めてきた PLLA とポリエチレングリコール(PEG)からなるマルチブロック共重合体に対する組織反応について詳細に検討した。

<実験> PEG/PLLA マルチブロック共重合体は、Oligo L-lactic acid(OLLA)、polyethylene glycol(PEG)、および 1,10-decanedicarboxylic acid(DDA)に、溶媒として diphenyl ether、触媒として tin(II)oxide を加えて、180℃、30mmHg 下で直接脱水重縮合法により、様々な組成比の OLLA/PEG マルチブロック共重合体を合成した。触媒として酸化スズを用いた PEG, PLLA, DDA の直接重縮合により合成した。得られたマルチブロック共重合体のフィルム、および、多孔質体をラット皮下に埋入し、所定期間後の組織反応について検討した。



Scheme 1. Multiblock copolymerization of OLLA, PEG, and DDA.

<結果・考察> フィルムサンプルに対するカプセル化反応を比較すると、PLAフィルムに対しては高密度のカプセル化層が生成したが、マルチブロック共重合体ではPEG組成の上昇とともにカプセル化層の厚みが減少し、さらに、その密度も低下した。また、PLAフィルムに対して多くの炎症系細胞が浸潤したのに対して、マルチブロック共重合体フィルムに対しては極めてマイルドな組織反応であった。多孔質体サンプルに対する組織反応においても、同様の傾向が認められた。さらに、多孔質構造内への周囲組織の浸潤挙動についても併せて報告する。

1) Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T., *Biomaterials*. **24**, 2303-2308 (2003).

#### Analysis and control of tissue reaction against the scaffold for blood vessel regeneration

Yasuaki OKADA<sup>1,2</sup>, Atsushi MAHARA<sup>1</sup>, Yuichi OHYA<sup>2,3</sup>, Tatsuro OUCHI<sup>2,3</sup>, Tetsuji YAMAOKA<sup>1</sup> (<sup>1</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan and <sup>2</sup>Faculty of Engineering and <sup>3</sup>High Technology Research Center, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan) Tel: 06-6833-5012 (Ex.2637), Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

**Key Word:** scaffold / poly(lactic acid) / poly(ethylene glycol) / multiblock copolymer / blood vessel

**Abstract:** Films and porous materials of poly(lactic acid) (PLA) and PEG/PLA multiblock copolymers were subcutaneously implanted to rats and the tissue reactions after a given period of time was investigated. A much thicker encapsulation was observed against PLLA films than the case of multiblock copolymer films. The tissue ingrowth against the porous materials also depended on the characteristics of the matrices.

## Electrospun nanofibrous scaffold made from PHA copolymers: fabrication, physical characterization, tissue response and *in vitro* degradation

<sup>1</sup>RIKEN, <sup>2</sup>Universiti Sains Malaysia, <sup>3</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, <sup>4</sup>Tokyo University  
O TANG Hui Ying <sup>1,2</sup>, Daisuke Ishii <sup>1</sup>, Atsushi Mahara <sup>3</sup>, Sunao Murakami <sup>3</sup>, Tetsuji Yamaoka <sup>3</sup>, Kumar  
Sudesh <sup>1,2</sup>, Razip Samian <sup>2</sup>, Masahiro Fujita <sup>1</sup>, Mizuo Maeda <sup>1</sup>, Tadahisa Iwata <sup>4</sup>

### <Introduction>

In response to the growing demand in the field of tissue engineering, past and on-going researches are focusing on polyhydroxyalkanoates as potential biomaterials. The most common PHA, poly(3-hydroxybutyrate), has limited application due to its high brittleness, poor processability and slow degradation<sup>1</sup>. The potential of three types of electrospun PHA copolymers; poly(3-hydroxybutyrate-co-5mol% 3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-5mol%-3HHx)], poly(3-hydroxybutyrate-co-7mol%-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-7mol%-4HB)] and poly(3-hydroxybutyrate-co-97mol%-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-97mol%-4HB)], as medical implant was investigated in this study because they have wider range of mechanical properties and thermoplastic applications as well as improved bioabsorption compared to P(3HB). Recently, electrospinning has emerged as one of the simple and versatile methods in preparing medical biomaterials with dimensions approaching the native profile of extracellular matrix. Thus, in this study, electrospinning was used to develop nanofibrous PHA copolymer scaffolds in aim of achieving enhanced biocompatibility, mechanical properties and bioabsorption.

### <Experiment>

For electrospinning, 1wt% of each PHA copolymers; [P(3HB-co-5mol%-3HHx)] ( $M_w = 1.4 \times 10^6$ ), [P(3HB-co-7mol%-4HB)] ( $M_w = 9.6 \times 10^5$ ) and [P(3HB-co-97mol%-4HB)] ( $M_w = 8.5 \times 10^5$ ), was prepared by dissolution in 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol. The electrospun PHA copolymers were implanted subcutaneously in Wistar rats for 4 and 12 weeks of *in vivo* evaluation. The *in vitro* degradation of the electrospun PHA copolymers was also investigated by exposing them to phosphate buffer solution (pH 7.4, 37°C) for 4 and 12 weeks. The degrees of *in vivo* and *in vitro* degradation were evaluated using scanning electron microscope, tensile test, gel permeation chromatography and wide-angle X-ray diffraction. The tissue response towards the implanted PHA copolymers was determined by histological observation.

### <Results and Discussion>

SEM revealed that both the *in vivo* and *in vitro* surface erosion of the electrospun PHA copolymers progressed dependently on the individual fiber dimensions and monomeric contents. Tensile test showed that while the Young's modulus is influenced by the monomeric contents, the ultimate tensile strength of all the electrospun PHA copolymers is mainly affected by the geometrical structures of the fibers. The mechanical properties demonstrated by all samples were comparable to those of human skin thus suggesting that their structures are able to provide sufficient biomechanical support. GPC showed that bioabsorption proceeds much faster than *in vitro* biodegradation. The local tissue response to all the samples was found to be mild and hence confirming their biocompatibility. This study demonstrated that PHA copolymers are successfully electrospun to create nanofibrous scaffolds with improved biocompatibility, mechanical properties and bioabsorption.

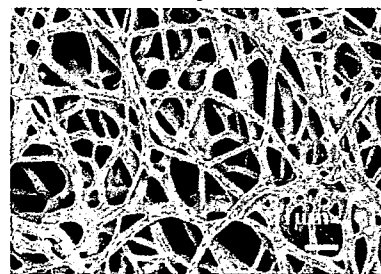


Fig. 1 Electrospun P(3HB-co-97mol%-4HB)

### <References>

1. Saad, G.R.; Lee, Y.J.; Seliger, H. *J Appl Polym Sci* 2002, 83, 703-712.

## Electrospun nanofibrous scaffold made from PHA copolymers: fabrication, physical characterization, tissue response and *in vitro* degradation

Hui Ying TANG<sup>1,2</sup>, Daisuke ISHII<sup>3</sup>, Atsushi MAHARA<sup>4</sup>, Sunao MURAKAMI<sup>4</sup>, Tetsuji YAMAOKA<sup>4</sup>, Kumar SUDESH<sup>1,2</sup>, Razip SAMIAN<sup>2</sup>, Masahiro FUJITA<sup>1</sup>, Mizuo MAEDA<sup>1</sup> and Tadahisa IWATA<sup>5</sup> (<sup>1</sup>Bioengineering Laboratory, RIKEN Institute, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan, <sup>2</sup>Universiti Sains Malaysia, 11800 Penang, Malaysia, <sup>3</sup>Eco-Soft Material Research Unit, RIKEN Institute, <sup>4</sup>Department of Biomedical Engineering Advance Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan and <sup>5</sup>Sciences of Polymeric Materials, Department of Biomaterial Sciences, Tokyo University) <sup>1</sup>Tel: +81- 048-467-9403. Fax: +81- 048-462-4667, Email: mfujita@riken.jp

**Key Word:** Nanofiber; P(3HB-co-3HHx); P(3HB-co-4HB); tissue response; bioabsorption

**Abstract:** Poly(3-hydroxybutyrate-co-5mol%-3-hydroxyhexanoate), poly(3-hydroxybutyrate-co-7mol%-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-97mol%-4-hydroxybutyrate) were electrospun in aim of fabricating scaffolds with enhanced biocompatibility, mechanical properties and bioabsorption. X-ray diffraction revealed that P(3HB-co-5mol% 3HHx) is highly crystalline, thus showing the highest Young's Modulus but slowest bioabsorption rate. Interestingly, the mechanical properties of all as-spun nanofibers were found to be comparable to those of human skin. This study demonstrated that high 4HB content facilitates rapid bioabsorption and elicits minimal tissue inflammation *in vivo*.



*In vitro* 血管組織再生のための灌流型バイオリアクター内遺伝子導入システム

国循セ研・大阪工大工 ○山本敬介、国循セ研 馬原淳、

大阪工大工 平野義明、国循セ研 山岡哲二

<緒言>

細胞と足場材料を用いた組織の三次元構築を静置培養で試みる場合、足場材料の内部まで酸素や栄養が届かないために、組織が壊死することが多い。そこで、酸素や栄養をスキヤホールド内部にまで供給させることができるバイオリアクター装置を用いた三次元構築が試みられている。

我々は、これまでに、灌流型バイオリアクターを用いた血管組織の再生を検討し、単層培養と同程度の細胞増殖効率を達成してきた。一方、2005年、Sheaらのグループは、PLG多孔質体に血管内皮増殖因子(VEGF)をコードしたプラスミドを付着させ、マウスに移植することで血管組織再生の亢進を報告した。<sup>1)</sup>しかし、プラスミドのみでは、その発現効率が低いことが知られている。そこで、新たに設計した疎水化ポリカチオンキャリアーを合成した。

本研究ではバイオリアクター内で、ヒト平滑筋細胞に対して *in vitro* VEGF 遺伝子導入を試み、VEGF mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により評価することで導入条件の最適化を図り、組織再生速度のさらなる向上を目指した。

<方法>

灌流型バイオリアクター内で用いる足場として 2wt% 中空ポリ乳酸スキヤホールドを作製した。10  $\mu$ g のプラスミド VEGF と新規疎水化ポリカチオンキャリアーである poly (DMPAA46-co-MPC53-co-stearylacrylate) (S-polymer)を用いて、アニオンとカチオンの比が 1:12 になるようにスキヤホールドに対してポリプレックスをコートした。また、プラスミド VEGF のみをコートしたもの、および、未コートのポリ乳酸スキヤホールドも調製した。灌流型バイオリアクター装置を Fig.1 に示すように組み立て、上記の各スキヤホールドを取り付け、これに平滑筋細胞  $2.0 \times 10^6$  個/mL の懸濁液を  $1.1 \text{ mL/cm}^2 \cdot \text{min}$  の灌流速度で 24 時間播種し、 $4.0 \text{ mL/cm}^2 \cdot \text{min}$  の灌流速度でさらに 48 時間培養を行った。その後、ポリ乳酸スキヤホールドに接着した平滑筋細胞から mRNA を抽出し、RT 反応を行った後、VEGF 遺伝子が導入されているか否かを確認するため、リアルタイム PCR を用いて VEGF の発現量の解析を行った。

<結果・考察>

pVEGF と S-polymer をコートしたポリ乳酸スキヤホールドを用いた場合に最も高い VEGF 発現量が得られた。このことから、pVEGF と S-polymer をコートしたスキヤホールドを用いた場合、細胞はポリプレックスを効率よく取り込んでいると考えられる。さらに、静置培養と灌流下での遺伝子導入効率の比較についても言及する。

参考文献

[1] Jang JH, Rives CB, Shea LD. et al. Mol Ther. 2005, 12(3), 475-483

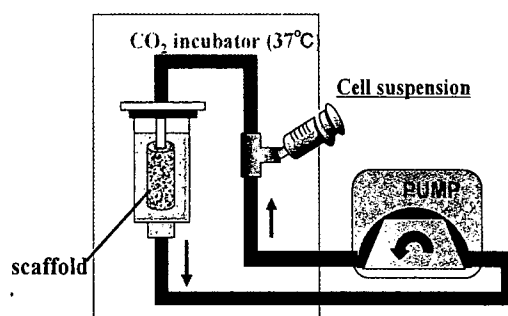


Fig.1. the radial-flow perfusion bioreactor

Gene transfer in the radial-flow perfusion bioreactor for *in vitro* tissue regeneration

Keisuke YAMAMOTO<sup>1,2</sup>, MAHARA Atsushi<sup>1</sup> Yoshiaki HIRANO<sup>2</sup>, and Tetsuji YAMAOKA<sup>1</sup>(<sup>1</sup>National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan and <sup>2</sup>Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi Ward, Osaka City, Osaka Prefecture 535-8585, Japan)

<sup>1</sup>Tel: 06-6833-5012 (2637) Fax:06-6835-5476 E-mail:yamtet@ri.ncvc.go.jp

**Key Word:** vascular tissue / radial-flow perfusion bioreactor / smooth muscle cell / PLA scaffold / VEGF gene

**Abstract:** We have been studying the regeneration of vascular tissue in the radial-flow perfusion bioreactor, and the novel perfusion seeding/culture system was successfully established. In the present research, *in vitro* reverse transfection of the smooth muscle cells with VEGF gene using a novel hydrophobic carrier (S-polymer) in the perfusion bioreactor was investigated. PLA scaffold was coated with pVEGF/S-polymer polyplexes and set in the reactor. A smooth muscle cell suspension was applied to this system and cultured for 72 hrs, and the amount of VEGF gene was evaluated by RT-PCR measurement for VEGF mRNA. The S-polymer lead to very high gene expression under the perfusion bioreactor relative to the naked pVEGF coating.

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

<sup>1</sup>国循セ研、<sup>2</sup>京工織大院工芸科学、

○内田翔<sup>1,2</sup>、藤里俊哉<sup>1</sup>、小堀哲生<sup>2</sup>、村上章<sup>2</sup>、山岡哲二<sup>1</sup>

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

〔実験〕減圧脱水重縮合によって合成したオリゴ-L-乳酸(OLLA)を無水酢酸と反応し、OH 末端アセチル化オリゴ-L-乳酸(acOLLA)を合成した。その後、Fmoc 固相合成法で合成したオリゴペプチドに固相担体上でオリゴ-L-乳酸をカップリングした。得られたオリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチドコンジュゲート(acOLLA-RGD)をポリ-L-乳酸溶液に添加した。この混合溶液を用いて、スピコート法によりフィルムを作製した。作製したフィルムに NIH/3T3 細胞を  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 播種し、3 時間後の接着細胞数を定量した。

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

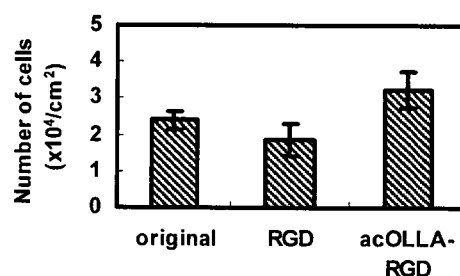


Figure.1. NIH/3T3 cell adhesion on original and acOLLA-RGD(2wt%/PLLA)-modified PLLA films. Cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 3h at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> (serum free medium). All values are mean  $\pm$  SD (n=3).

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

Sho UCHIDA<sup>1,2</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>1</sup>, Akio KOBORI<sup>2</sup>, Akira MURAKAMI<sup>2</sup>, and Tetsuji YAMAOKA<sup>1</sup>

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

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

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

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

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

## 移植細胞の可視化を目的とした MRI 用高分子造影剤の開発

国立循環器病センター研究所 生体工学部 ○橘 洋一・山岡 哲二

国立循環器病センター研究所 放射線医学部 圓見 純一郎・飯田 秀博

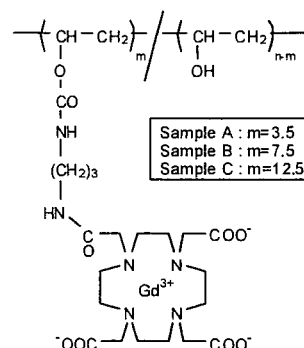
## &lt;緒言&gt;

近年、再生医学の進歩により細胞移植治療が数多く検討され、心筋障害モデルを用いた細胞の移植（例えば心筋細胞、血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞、平滑筋細胞、骨髄細胞）では、心室壁の菲薄化、心拡大の制御により心機能の改善が報告されてきた。現在では、更なる治療の効率化・安全性の向上のため、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が高まっている。

本研究は、移植細胞の追跡と組織再生のイメージングを目指して、MRI(Magnetic Resonance Imaging)に着目し、新たな細胞追跡用 MRI 造影剤の開発を目的とする。我々は、非生分解性高分子（ポリビニルアルコール）に既存の MRI 用造影剤を導入し、高分子-造影剤コンジュゲートの合成を行った。さらに、得られたコンジュゲートを細胞内へ導入し、MRI を用いて細胞内における造影剤の挙動及び造影剤を導入した細胞の評価を行った。

## &lt;実験&gt;

非生分解性高分子として知られているポリビニルアルコール（DP:1700, DS:98%）に対して、脱水縮合剤として 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で 1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) を導入し、続いて DOTA 内にガドリニウムを内包させることで、導入率の異なる 3 種類の生成物を合成した（右図）。得られたコンジュゲートの MRI 用造影剤としての評価を行った。また、本コンジュゲートを NIH-3T3 細胞内に導入し、ポリマーの細胞内挙動について検討した。さらに、コンジュゲートを導入した細胞の挙動について検討を行った。



## &lt;結果・考察&gt;

細胞は NIH-3T3 を用い、得られたコンジュゲートの細胞毒性試験を行ったところ、汎用性造影剤であるマグネビストより毒性が低いことが確認された。さらに、エレクトロポレーション法を用いて細胞内にコンジュゲートを導入した後、毒性及び細胞内滞在性について検討した。この結果、本コンジュゲートを導入した細胞の増殖速度は、導入していない細胞と同程度であり、また、最低 10 日間、コンジュゲートは細胞内に安定に滞在することがわかった（Figure 1）。次に、MRI を用いて、コンジュゲートを導入した細胞の撮像を行ったところ、導入していない細胞に比べて輝度の増加が見られ、細胞の撮像に成功した。更に、*in vivo* イメージングについても検討を行った。

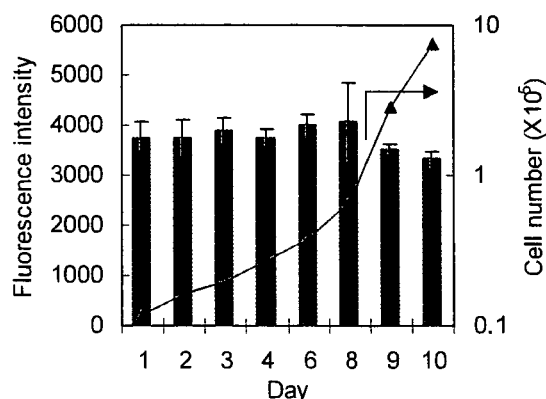


Figure 1. Growth of NIH-3T3 cells (▲) and amount of residual FITC-labeled PVA-Gd in the cells (■)

**Synthesis of new contrast agents of MRI for cell tracking**

Yoichi, Tachibana<sup>1</sup>; Jyunichiro, Ennmi<sup>2</sup>; Hidehiro, Iida<sup>2</sup> and Tetsuji, Yamaoka<sup>1</sup>. (<sup>1</sup> Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center and <sup>2</sup> Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute) TEL: +81-6-6833-5012 (ext 2621) FAX: +81-6-6835-5476 E-mail: [yamtet@ri.ncvc.go.jp](mailto:yamtet@ri.ncvc.go.jp)

**Key Word:** MRI / contrast agent / cell tracking / cell transplantation

**Abstract:** Novel contrast agents were synthesized by conjugating Gd to PVA. The intracellular behavior of these PVA-Gd conjugates was examined using FITC-labeled PVA-Gd. Furthermore, the ability of these PVA-Gd conjugates to enhance the contrast in the MRI image of the cells was studied. At a high concentration, enhanced image of the cells was observed.

## 移植細胞の長期追跡を目的とした高分子 MRI 用造影剤の開発

### Synthesis and Applications of New Contrast Agents for *In Vivo* Cell Tracking

橋 洋一<sup>1)</sup>、圓見 純一郎<sup>2)</sup>、山本 明秀<sup>2)</sup>、飯田 秀博<sup>2)</sup>、山岡 哲二<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 生体工学部、

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

Yoichi Tachibana, <sup>1)</sup> Jyunichiro Ennmi, <sup>2)</sup> Akihide Yamamoto, <sup>2)</sup> Hidehiro Iida, <sup>2)</sup> Tetsuji Yamaoka <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Biomedical Engineering, <sup>2)</sup> Department of Investigative Radiology,

Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute.

#### <緒言>

近年、細胞移植治療が進む中、治療技術の発展が強く求められている。一方で、治療過程については、未だブラックボックスな点が多い現状である。細胞移植医療における治療過程を把握することは、より正確な治療を可能にするだけでなく、治療効果の飛躍的向上にもつながると考えられる。

本研究は、移植細胞の追跡と組織再生のイメージングを目指して、MRI(Magnetic Resonance Imaging)に着目し、新たな細胞追跡用 MRI 造影剤の開発を目的とする。我々は、非生分解性高分子(ポリビニルアルコール)に既存の MRI 造影剤を導入し、高分子-造影剤コンジュゲートの合成を行った。さらに、得られたコンジュゲートを細胞内へ導入し、MRI を用いて細胞内における造影剤の挙動及び造影剤を導入した細胞の評価を行った。

#### <実験>

非生分解性高分子として知られるポリビニルアルコール (DP:1700, DS:98%) に対して、脱水縮合剤として 1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で 1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA)を導入し、続いて DOTA 内にガドリニウムを内包させることで、導入率の異なるポリビニルアルコール誘導体を合成した。得られた誘導体の MRI 造影剤としての評価を行った。また、モデル細胞として NIH-3T3 細胞を用いて、誘導体を細胞内に導入し、細胞内における挙動、及び、細胞の MRI 撮像について検討した。

#### <結果・考察>

細胞は NIH-3T3 を用い、得られたコンジュゲートの細胞毒性試験を行ったところ、汎用性造影剤であるマグネビストより毒性が低いことが確認された。さらに、エレクトロポレーション法を用いて細胞内にコンジュゲートを導入した後、毒性及び細胞内滞在性について検討した。この結果、本コンジュゲートを導入した細胞の増殖速度は、導入していない細胞と同程度であり、また、最低 10 日間、コンジュゲートは細胞内に安定に滞在することがわかった。次に、MRI を用いて、コンジュゲートを導入した細胞の撮像を行ったところ、導入していない細胞に比べて輝度の増加が見られ、細胞の撮像に成功した。更に、*in vivo* イメージングについても検討を行った (右図)。



高分子造影剤を内包した細胞の *in vivo* イメージング

### Development of vascular grafts having an in situ repopulation ability

Dohiko Terada<sup>1,2</sup>, Kazuya Sawada<sup>3</sup>, Hiroyuki Ogata<sup>2</sup>, Kaori Hiraku<sup>2</sup>, Wakako kamata<sup>2</sup>, Ken'ichi Yoshida<sup>4</sup>, Seiichi Funamoto<sup>2</sup>, Noritoshi Nagaya<sup>2</sup>, Akio Kishida<sup>5</sup>, Toshia Fujisato<sup>2</sup>, Takeshi Nakatani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Japan Association for the Advancement of Medical Equipment, Tokyo, Japan,

<sup>2</sup>National Cardiovascular Center, Osaka, Japan, <sup>3</sup>Osaka Seikei College, Osaka, Japan,

<sup>4</sup>Foundation for Biomedical Research and Innovation, Hyogo, Japan, <sup>5</sup>Tokyo Medical Dental University, Tokyo, Japan

#### Introduction

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

#### Materials and Methods

Porcine aorta was isolated from the Clawn miniature pig (Japan Farm, Co. Ltd.). The tissue was placed in a vacuum oven at 120°C to cross-link collagen fibers. Elastin fibers were then taken away from the tissue by enzymatic digestion using elastase of 0.56 u/ml in tris buffer solution including CaCl<sub>2</sub> of 10 mM and NaN<sub>3</sub> of 0.02% at 37°C with gentle stir. The tissues were incubated in 80% ethanol solution for 3 days at 37°C to remove phospholipids from the inside. The obtained tissues were subjected to histological and biomechanical studies. The vascular grafts made of miniature pig descending aorta were transplanted allogeneically. After 3 months of the implantation, the grafts were explanted and examined histologically.

#### Results and Discussion

The elastic fibers were digested enzymatically even after the cross-link and it was confirmed histologically that the tissue has no elastic fiber and cellular component inside (Fig. 1). The collagen fibers remaining in the tissue were also degraded completely by collagenase and it means that the biodegradability of the tissue was not affected by



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

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

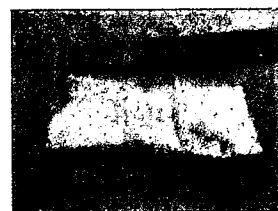


Fig.2 The intimal surface of the explanted graft. Implantation period was 3M. Scaffold part is shown in the figure.

A large amount of the cell migration into the graft was observed (Fig. 3). These cells were identified immunohistologically as smooth muscle cells and fibroblasts. And no calcific deposition was seen in the explanted graft after 3 months of the implantation.



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

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

#### References

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

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

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

1) NATIONAL CARDIOVASCULAR CENTER RESEARCH INSTITUTE, Osaka, JAPAN

2) OSAKA INSTITUTE OF TECHNOLOGY, Osaka, Japan

### Introduction

Replacing lost soft tissue due to trauma, diseases, or congenital anomalies is still challenging issue in plastic and reconstructive surgeries. In vitro tissue engineering of functional skeletal muscle would be an important subject because to provide physiological functions and physical shape by transplantation of tissue-engineered muscle would increase quality of patients' life.

Recently, it is reported that mesenchymal stem cells have ability to differentiate into skeletal muscle cells in conventional monolayer culture by addition of 5-azacytidine to their medium.<sup>1)</sup> On the other hand, it is well known that dynamic stretch culture induces differentiation of the satellite cells and myoblasts into the skeletal muscle cells.<sup>2)</sup>

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

### Materials and Methods

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

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

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

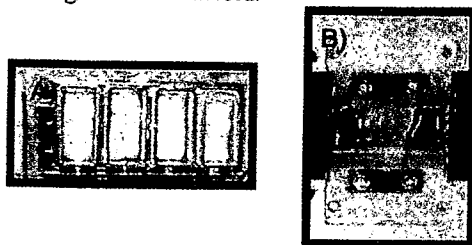


Fig. 1. Cells cultured in the scaffold. A) After cell inoculation into the scaffold, cells were cultured in the chamber for 3 days. B) On the 3<sup>rd</sup> day of pre-culture, scaffold were clipped at both edges and stretched

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

### Results and Discussion

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

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



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

### Conclusions

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

### References

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

### Acknowledgements

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

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

Toshia . Fujisato<sup>1</sup>; Dohiko . Terada<sup>1</sup>; \* Kazuo . Niwaya<sup>1</sup>; Kenji . Minatoya<sup>1</sup>; Akio . Kishida<sup>2</sup>; \* Takeshi . Nakatani<sup>1</sup>; \* Soichiro . Kitamura<sup>1</sup>

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

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

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

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

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

3D12

## 移植用生体弁の力学評価

大阪工業大学 ○寺田堂彦、藤里俊哉

## 結 言

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

## 実 験

## 試料準備

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

## 引張試験

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

## 結果と考察

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

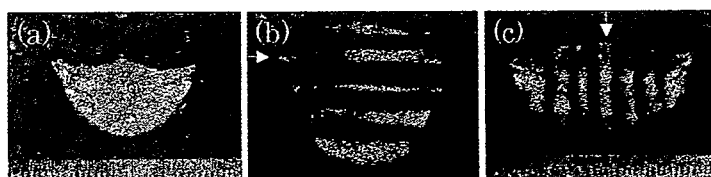


Fig.1 (a) appearance of aortic valve leaflet and (b) circumferential and (c) radial strips for tensile test. Arrows in the figure point specimens of each tensile directions.

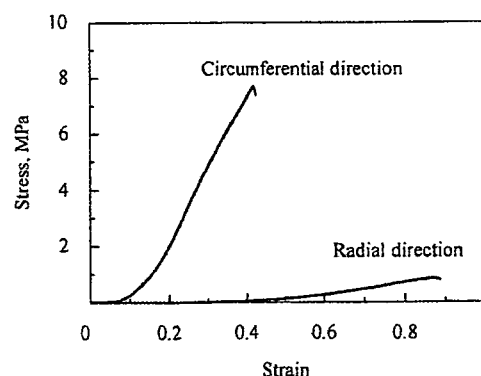


Fig.2 Stress-strain curves of valvular strip in circumferential and radial direction.

Mechanical test for biological valvular graft, Dohiko TERADA, Toshia FUJISATO, Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 〒535-8585, Tel +81-6-6954-4746, e-mail terada@bme.oit.ac.jp



## 3D05

## MRIを用いた移植細胞の追跡技術の開発

(国循セ研・生体工学部) ○橘洋一、山岡哲二  
(国循セ研・放射線医学部) 圓見純一郎、飯田秀博

## 緒言

近年、再生医工学の進歩により、細胞移植治療の良好な回復結果が報告されている。それに伴い、回復過程の正確な追跡と診断の重要性が高まっており、生体内でのイメージング技術の発展に大きな注目が集まっている。中でも、蛍光イメージング技術に関する研究は数多く行われているが、蛍光プローブの検出深度が約1cmであるということから、大動物や臨床への応用は不可能である。そのため、移植細胞の新たな追跡技術が模索されてきた。

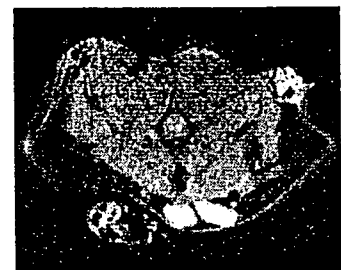
我々は、移植細胞の追跡ツールとして magnetic resonance imaging (MRI)に着目してきた。MRIは、非侵襲で、且つ高解像度で内部構造を観察できる。この特徴を利用し、新たな移植細胞の追跡技術の開発へと着手した。

## 実験

非生分解性高分子として知られるポリビニルアルコール (DP:1700, DS:98%) に対して、脱水縮合剤として1,1'-カルボニルビス-1H-イミダゾールを用い、任意の割合で1,3-プロパンジアミンを反応させた。さらに、側鎖アミノ基に対し、1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA)を導入し、続いてDOTA内にガドリニウムを内包させることで、導入率の異なるポリビニルアルコール誘導体を合成した。また、蛍光指標も同時に行った。得られた誘導体のMRI用造影剤としての評価を行った。また、誘導体をNIH-3T3細胞に導入し、細胞内における挙動、及び、細胞のMRI撮像について検討した。更に、標識細胞をラット皮下に移植した後の *in vivo* イメージングについても検討した。

## 結果・考察

得られたコンジュゲートの細胞毒性は、汎用性造影剤であるマグネビストより低いことが確認された。さらに、エレクトロポレーション法を用いて細胞内にコンジュゲートを導入した後、毒性及び細胞内滞在性について検討した。この結果、本コンジュゲートを導入した細胞の増殖速度は、導入していない細胞と同程度であり、また、最低10日間、コンジュゲートは細胞内に安定に滞在することがわかった。次に、MRIを用いて、コンジュゲートを導入した細胞の撮像を行ったところ、導入していない細胞に比べて輝度の増加が見られ、細胞の撮像に成功した。更に、ラットの皮下にコンジュゲート導入細胞を移植し、*in vivo* イメージングを行ったところ、コントロール (何も導入していない細胞) と比較してコントラストの増加が見られた (右図)。本研究で得られた、細胞内滞在性を有する造影剤を用いることで、目的とする細胞のトラッキングが可能となった。



高分子造影剤を内包した細胞の *in vivo* イメージング

## Synthesis of new contrast agents of MRI for cell tracking

Yoichi, Tachibana<sup>1</sup>, Jyunichiro, Ennmi<sup>2</sup>, Hidehiro, Iida<sup>2</sup> and Tetsuji, Yamaoka<sup>1</sup>. (<sup>1</sup> Department of Biomedical Engineering and <sup>2</sup> Department of Investigative Radiology, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute)

TEL: +81-6-6833-5012 (ext 2637) FAX: +81-6-6835-5476 E-mail: [yantet@ri.ncvc.go.jp](mailto:yantet@ri.ncvc.go.jp)

## 2P-60 放射線照射による脱細胞バイオスキャホールドの調製

大阪工業大学：藤里俊哉

原子力機構・量子ビーム：菊地正博、坂下哲哉、舟山知夫、小林泰彦

東京医科歯科大・生体材料工学研：船本誠一、木村剛、岸田晶夫

国立循環器病センター研究所：山岡哲二

### 1. はじめに

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

### 2. 実験方法

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

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

### 3. 結果及び考察

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

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

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



未照射



1000Gy

図1 脱細胞化ブタ血管組織のラット皮下埋植（2週間、左：マクロ、右：HE）

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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