

P-1

超高压処理技術を応用した人工角膜の作製と評価

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

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

【はじめに】

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

【実験方法】

成体ブタの眼球((株)東京芝浦臓器)を購入し、角膜を採取した。超高压印加装置を用い、10℃と30℃にて4,000~10,000気圧の超高压印加を10分間行った。続いて3日間の洗浄を行い、細胞残渣を除去した。得られた組織を組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。また、透過率、力学特性の測定およびウサギを用いた*in vivo*試験により基礎評価を行った。

【結果と考察】

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

1112 再生型心臓弁の特性評価

Characterization of Regenerative Heart Valve.

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

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

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

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

[緒言]

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

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

[実験]

試料

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

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

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

試料準備

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

引張試験

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

[結果と考察]

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

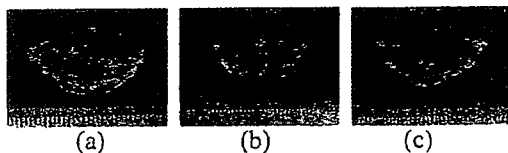


Fig. 1 Appearance of native porcine aortic valve. (a), right coronary cusp (RCC); (b), non coronary cusp (NCC); (c), left coronary cusp (LCC).



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

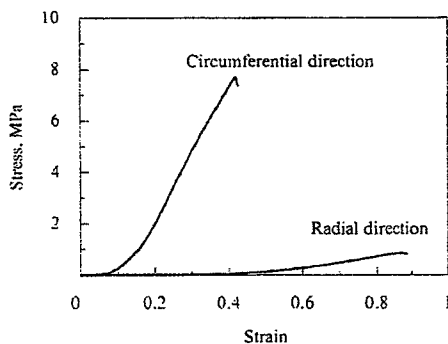


Fig. 3 Stress-strain curves of valvular strip in circumferential and radial direction.

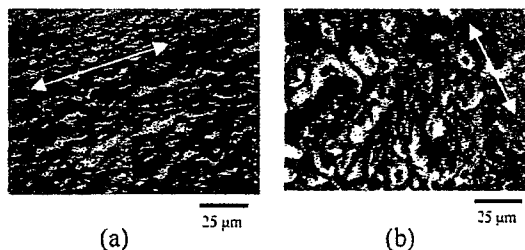


Fig. 4 Elastica van Gieson staining of a cross-section on (a) circumferential and (b) radial directions of a native porcine valvular leaflet. Arrow in the figure shows each direction.

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

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

図6に、再生型心臓弁とネイティブブタ心臓弁の円周方向

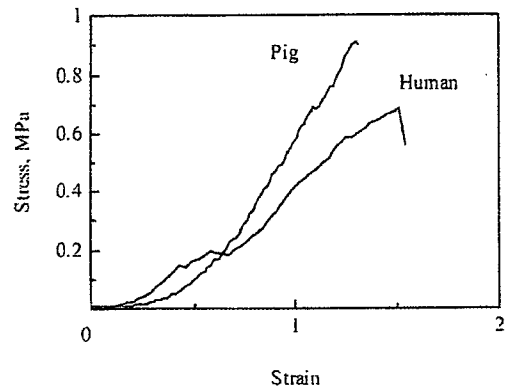


Fig. 5 Stress-strain curve of a human and a porcine valve leaflet. Tensile direction is parallel to circumferential direction of a valve leaflet.

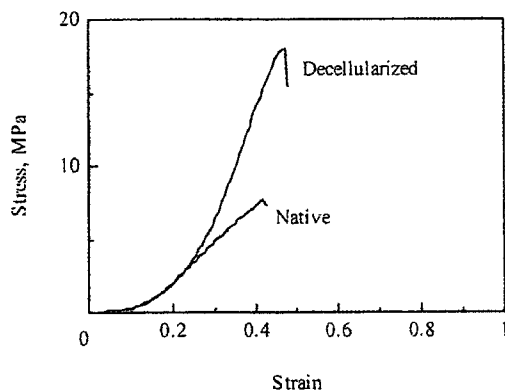


Fig. 6 Stress-strain curves of a decellularized and a native porcine valve leaflet. Tensile direction is parallel to radial direction of a valve leaflet.

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

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

電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御

Control of skeletal muscle cell contraction by electric pulse

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

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

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

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

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

1. 緒言

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

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

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

マウス横紋筋由来株化細胞 C2C12 を, 1.0×10^4 cells/cm² の密度で 60 mm コラーゲンコートディッシュ (Dish) と Type-I コラーゲンを形成したディッシュ (Gel) に播種した。培養液には 10 % 牛胎児血清を含む High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を用い, 37°C, CO₂ 5 % の環境下で 4 日間培養を行った。その後, 筋芽細胞の融合を促進させるため, 培養液を 7 % 馬血清を含む DMEM に変更し, 培養を行った。培養液の交換は 2 日毎に行い, その際に位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察した。

2-2. 電気刺激実験

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

2-3. 細胞の収縮弛緩の評価

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

3. 結果

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

パルス電気刺激したところ, 入力電圧 10V_{pp} から 45V_{pp} の間において, 周波数 0.5 Hz から 2 Hz の範囲で同期して収

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

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

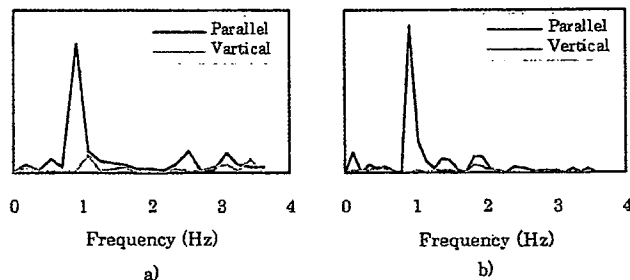


Fig. 1 Spectrum of C2C12 contraction by electric pulse. a) Dish, b) Gel

4. 考察

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

5. 謝辞

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

6. 参考文献

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

A112 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御

Control of myotube contraction by electrical pulse

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

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

Hiroyuki HAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology
Hiroyuki KOBAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology
Sadahito UTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology
Hideo KONDO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology
Shigehiro HASHIMOTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology
Toshia FUJISATO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

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

1. 緒言

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

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

筋芽細胞として、マウス横紋筋由来株化細胞C2C12細胞を使用した。C2C12細胞を直径60 mmのコラーゲンコートディッシュに細胞密度 1.0×10^4 cells/cm²で播種した。培養液には10%ウシ胎児血清(FBS)、抗生物質を含むHigh-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HG-DMEM)を用いた。4日間培養した後、筋管細胞の形成を促進させるため、培養液を7%馬血清、抗生物質を含むHG-DMEMに変更した。培養液の交換は2日毎に行い、その際に位相差顕微鏡にて細胞形態の変化を観察した。培養は37℃、5%CO₂、湿度100%の環境下で行った。

2-2. 筋管細胞収縮の周波数特性

パルス電圧に対する筋管細胞の周波数応答性を調べた。図1に実験システムの概略図を示す。培養10日後に白金平板電極をディッシュの端部に設置した。Waveform generatorから培養液中にパルス電圧を印加した。電界の方向は筋管細胞の長軸に対して平行(Parallel)および垂直(Vertical)とした。パルス幅を20 msecとし、入力電圧を10 Vp-pから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。取り込んだ動画をフレーム毎の静止面に分割し、グレースケール(0-255)に変換した。収縮弛緩する筋管細胞の輪郭周囲を任意に選択し、その領域の平均値を求めた。さらに平均値の時間変化をフーリエ変換し、周波数スペクトルを求めた。

2-3. クロナキシー測定

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

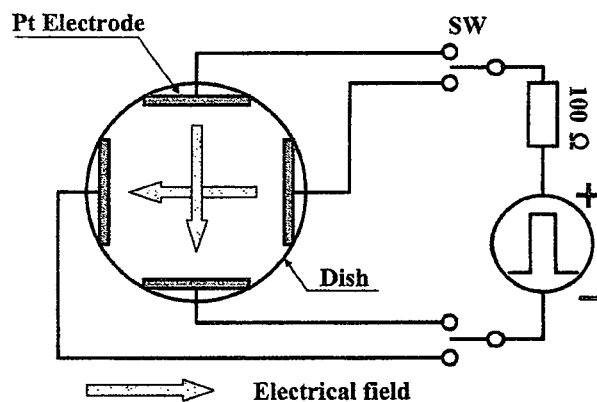


Fig.1 Schematic drawing of experimental system.

3. 結果

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

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

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

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

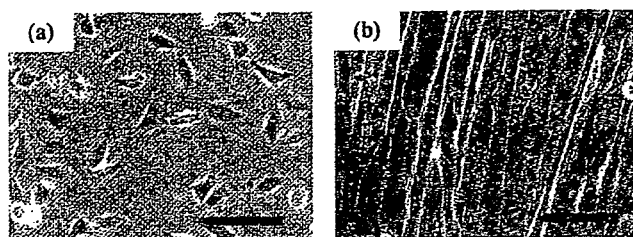


Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells at 2 hours (a) and at 10 days (b). Bar=100 μ m

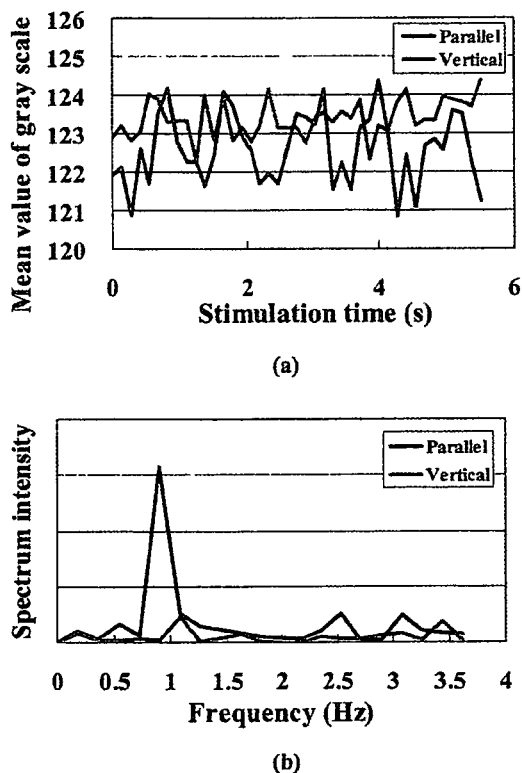


Fig.3 Results of image analysis of C2C12 contraction with electrical pulse at 10 days. (a) Mean value of gray scale, (b) Frequency spectrum.

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

4. 考察

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

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

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

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

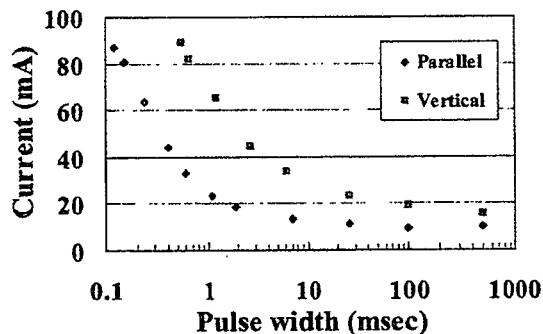


Fig.4 Strength-Duration curve.

5. 結論

本実験より以下の結論を得た。

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

謝辞

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

参考文献

- (1) 星宮望, 赤澤堅造, 筋運動制御系, 昭晃堂, (1993)
- (2) Mario Marotta et al. Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells. Bio Techniques 2004 ; 36 : 68-73
- (3) 宮島智, 岡久雄, 筋の振動特性とクロナキシー自動計測システムの開発, 信学技報, MBE2000-40, (2000) 9-16.

SY4-4 OVER ONE YEAR SUPPORT BY LEFT VENTRICULAR ASSIST SYSTEM AT NCVC

National Cardiovascular Center, Japan

T Nakatani, T Funatsu, T Kato, A Mano, N Oda, M Yanase, H Nakajima, Y Iba, J Kobayashi, T Yagihara, S Kitamura

From 1994, we applied several types of ventricular assist systems including extracorporeal type of Toyobo, implantable types of Novacor, HeartMate-VE and EvalHeart to 57 patients with acute deterioration of chronic heart failure. Of those, 48 (male: 33, female: 15, age: 15-58 (mean: 36) years old) were supported over 1 year. 44 were DCM, 3 were dHCM, and the other was ICM. Extracorporeal Toyobo LVAS was applied in 42 including one biventricular support, and implantable type was in the other. Body weight of 16 patients was less than 50 kg. Supporting duration was 371 - 1444 (714) days. All except 1 were listed as a candidate for heart transplantation. Of those, 20 were transplanted after 397 - 1444 (765) day's supports (15 were at our Center, the other 5 were in USA). Longest support was performed by Toyobo LVAS. All transplanted patients except 1 are doing well up to 8.25 years after transplant. 1 was died 4.2 years after transplant. 14 were died on LVAS after 371 - 1245 (750) day's supports. Causes of deaths were infection in 6, cerebral damage in 5, infection and cerebral damage in 2 and RV failure in 1. One was weaned from LVAS after 487 day's support and is doing well 8 months after removal. The other 13 are on-going for 381 - 923 (774) days. From our data, LVAS is useful for over 1 year support and extracorporeal type is suitable for small size patients.

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

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

Toshia Fujisato¹⁾, Dohiko Terada¹⁾, Kazuo Niwaya²⁾, Kenji Minatoya²⁾, Akio Kishida³⁾, Takeshi Nakatani²⁾, Soichiro Kitamura²⁾

OBJECTIVES

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

METHODS

Porcine tissues of the heart valves and aortae were isolated under the sterile condition. They were treated immediately by cold isostatic pressing (CIP) of 930 MPa followed by washing at 4°C for decellularization. This does not include any processes using detergents. The acellular scaffolds were transplanted to orthotopic positions of miniature pigs. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 3, 6 or 12 months after the transplantation and examined histologically and immunohistologically.

RESULTS

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

CONCLUSIONS

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

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

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

K. Yamasaki¹⁾, H. Hayashi¹⁾, S. Uto²⁾, T. Ehashi³⁾, S. Hashimoto¹⁾, H. Tsutsui¹⁾, S. Mochizuki¹⁾, H. Kondo¹⁾, M. Yoshiura¹⁾, T. Fujisato¹⁾

Background: Contractility of the tissue-engineered muscle with electrical signal has been required for the development of bio-actuator and muscle tissue regeneration. Although some investigators have already reported about the contraction of myotubes with electrical pulse, the strategy to improve their contractility has not been established. In this study, we discussed about the effect of variety of pulse stimulation on the contraction of skeletal muscle cells.

Method: The C2C12 cells were seeded on various treated substrates and cultured in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum. When the C2C12 cells reached confluence, the medium was changed to the DMEM containing 2% horse serum to allow them to differentiate to the C2C12 myotubes. Electrical stimulation was performed to the C2C12 myotubes and their contraction was observed under the phase contrast microscope at 37°C. The variations were made on amplitude, pulse duration, and frequency of voltage of 0 V-30 V, 0 msec-100 msec, and 0.05 Hz-10 Hz, respectively.

Result: The C2C12 myotubes contracted on collagen coated substrate at voltage up to 10 V at pulse duration up to 3 msec, and at frequency between 0.05 Hz to 4 Hz. The number of contracting tubes increased as frequency decreased. The motion of C2C12 myotube contraction depended especially on the pulse duration and frequency.

Conclusion: It is indicated that parameters of pulse duration and frequency of electrical stimulation are important for the control of myotube contraction.

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

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

Ehashi T¹⁾, Somekawa S¹⁾, Udagawa H²⁾, Fujisato T¹⁾,³⁾

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

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

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

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

P08 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養

○山崎 健一、寺田 堂彦、近藤 英雄、橋本 成広、藤里 俊哉
大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻

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

S6-4 心臓移植後拒絶反応の非侵襲的評価法；経胸壁心エコーによるストレイン映像法の有用性

国立循環器病センター 心臓血管内科 臓器移植部¹、同 生理機能検査部²、同 病理検査室³、同 心臓血管外科⁴、同 心臓血管外科 臓器移植部⁵

○加藤 倫子¹、橋本 修治²、築瀬 正伸¹、小田 登¹、真野 暁子¹、橋村 一彦¹、植田 初江³、駒村 和雄¹、北村惣一郎⁴、中谷 武嗣⁵

背景：心臓移植後の拒絶反応診断には、いまだ心筋生検による組織診断がゴールドスタンダードである。我々は経胸壁心エコーにて組織ドブラから得られたストレイン映像法を用い非侵襲的に拒絶反応を診断しうるか否かを検討した。方法および結果：32例の心臓移植後患者を対象に、延べ289回の心筋生検及び右心カテーテル検査と生検施行時より12時間以内に施行した経胸壁ストレイン映像法の結果を比較検討した。拒絶反応の診断は国際心肺移植学会 (ISHLT) の定める診断基準 (改変前) に従った。対象とした検査のうち205回の生検結果はISHLT grade 0ないし1a (group A)を示し、36回はgrade1b以上 (group B)を示した。収縮期ストレイン (ϵ_{sys})、収縮期ストレインレート (SR_{sys}) は左室12分割の平均値として計測した。 ϵ_{sys} (24 ± 5.8 vs. $30 \pm 7.9\%$, $P < 0.001$) 及び SR_{sys} (2.11 ± 0.55 vs. $3.16 \pm 1.17 /s$, $P < 0.01$) の絶対値はgroup Aでgroup Bと比し低下していた。僧帽弁輪部拡張期速度 E' はgrade3a以上を示した群で低下しており、左室流入波Eとの比 E/E' は増大していたが、groups AとBでの差は認めなかった。多変量解析では ϵ_{sys} 及び SR_{sys} のみが、grade1b以上の拒絶反応の予測因子であった。拒絶反応のgradingと血行動態指標との間に相関は認められなかった。結語：経胸壁ストレイン映像法により各々の患者における拒絶反応を非侵襲的に予測しうる可能性が示唆された。

○東 晃至^{1,2}, 中村友亮¹, 橘 洋一¹, 平野義明², 山岡哲二¹

1 国立循環器病センター研究所 生体工学部

2 大阪工業大学 工学部

【緒言】 コラーゲン架橋体など生体由来物質をスキャフォールドとして用いた人工真皮の開発が広く検討されている。しかしながら、これらの動物由来材料はその安全性の確保と品質の管理が容易ではないため、我々は、工業的に管理が可能な合成材料を用いた皮膚組織の再建を検討してきた。ポリ-L-乳酸(PLLA)とポリエチレングリコール(PEG)とのマルチブロック共重合体[以下 LE(m)-30]から作製した多孔質体は、柔軟性に富み、速やかに分解吸収され、PEG の分子量を2万以下にすれば分解後の体内蓄積性もない。さらに、周囲組織の浸潤性を亢進させるために、交互浸漬法によってハイドロキシアパタイト(HAp)と複合化し、*in vivo* 皮膚全層欠損モデルにおいて評価した。

【実験】 LE(m)-30、および、コントロールの PLLA を1,4-ジオキサンに溶解してガラスシャーレに注ぎ、-20℃で24時間凍結した後に凍結乾燥して、スポンジ状シートを作製した。次に、交互浸漬法(T.Taguchi et al., Chem Lett., 8, 11-12, 1998)を3サイクル施すことで、上記スポンジ状シートとHApとを複合化した。得られたHAp/マルチブロック複合化スポンジを1.5×1.5 cm²の大きさに切り取り、厚さ200 μmの緻密シリコン膜と貼り合わせることで二重構造の人工皮膚を作成した。

ウイスターラット(雄10週齢)の背部に1.5×1.5cm²の皮膚全層欠損を作製し、上記HAp複合化スポンジ状シートで置換した。その後、経時的に、創部の面積を測定することで、拘縮の度合いを評価し、その後、組織切片作成、H&E染色を行い評価した。

【結果および考察】 得られたLE(m)-30の重量平均分子量は約10万であった。分子量分布は約1.85であったことから、ほぼ、一般的な縮合重合で反応は進行していると思われる。SEM観察の結果、LE(m)-30スポンジ状シートの孔径は、ほぼ50 μm、また、水中での平衡含水率は約30%であった。

皮下埋2週間後のH&E染色の結果、PLLAの場合には、炎症系細胞遊走と毛細血管新生が顕著であったのに対して、LE(m)-30の場合には炎症反応は極めて軽微であった。創部面積の比較では、LE(m)-30の場合には、PLLAに比較して優位に拘縮が抑制されており、人工真皮材料としての有用性が示唆された。長期埋入実験の結果も併せて報告する。

Regeneration of skin tissue using organic-inorganic hybrid scaffolds

Koji Higashi^{1,2}, Yusuke Nakamura¹, Yoichi Tachibana¹, Yoshiaki Hirano², Tetsuji Yamaoka¹

1 Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

2 Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

16) 新規 MRI イメージング法による in vivo 細胞トラッキング

(国立循環器病セ研 生体工学部) 〇橋 洋一、山岡哲二
(国立循環器病セ研 放射線医学部) 圓見純一郎、山本明秀、飯田秀博

yamtet@ri.ncvc.go.jp

Tel:06-6833-5012 (内 2637) Fax:06-6835-5476

【緒言】

これまでの虚血性心不全に対する治療戦略の一つとして細胞移植療法が注目されている。この要因として、臓器移植治療における圧倒的なドナー不足が挙げられる。現在、細胞移植治療に関する研究は、ほぼすべての組織・臓器の再生が臨床応用を目指して行われており、皮膚、軟骨、血管などの再生は実用に耐えうる研究結果が示されている。しかし、臨床レベルだけでなく研究レベルにおいても、細胞移植治療に関する主な研究として、スタート(細胞移植)からゴール(移植部位の治癒)への一本槍的な研究が優先され、治癒過程についての研究はほとんど進んでいない現状である。細胞移植治療において、治癒過程における移植細胞を追跡することは、学術的な意義を持つだけでなく、治療法の飛躍的向上にもつながると考えられる。細胞移植治療法の開発・最適化を考えた場合、治癒過程の経時的な観察は、長期間・非浸襲・非破壊的であることが最大の課題となる。そのために、非浸襲・非破壊的に細胞を可視化することができる、既存の手法にない技術開発(細胞のラベル化)が切望されてきた。

これまでに蛍光剤を利用した細胞の標識化に関する膨大な研究があるが、大型動物を用いた長期間の細胞追跡には困難を伴う。これは、蛍光の検出深度が表層付近(約 1cm)であることに起因する限界があるためである。標識細胞を長期間観察するためには、より内部の組織(移植細胞・再生組織)を非浸襲で測定することが最大の課題となる。

我々は、それらを解決する方法として MRI に着目した。画像診断機器の中でも、MRI は、非浸襲・非破壊的に特定部位を観察できるだけでなく、任意の方向での撮像が可能であり、PET のように大掛かりな装置を必要としないため、汎用性が高いものである。

MRI を用いた移植細胞のラベル化を考えた場合、MRI の造影剤として以下の条件が必須と考えられる。

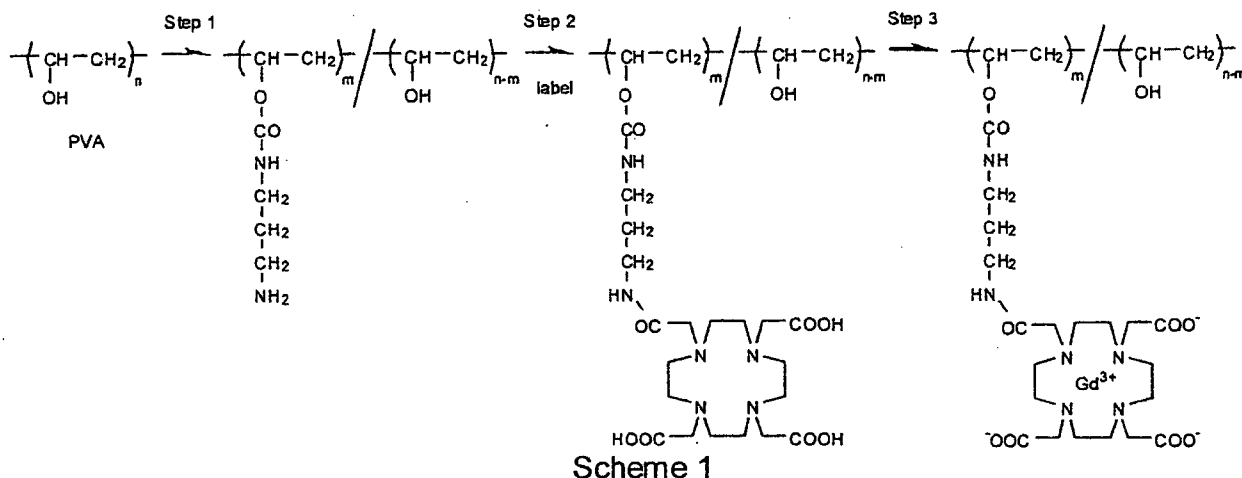
(1) 長期間、細胞内に滞在すること (2) 低い細胞毒性 (3) 低い体内残存性 (4) 十分な造影効果

本研究では、ポリビニルアルコール(PVA)を主鎖とし、ガドリニウムを中心金属としたキレート側鎖を導入し、MRI による細胞の追跡を可能にする新規造影剤を合成した。さらに、得られた造影剤を用いて、細胞のトラッキングを試みた。

【実験】

非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(Step 1)。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(Step 2)、続いて DOTA 内にガドリニウムを内包させる(Step 3)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(Scheme 1)。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、細胞として NIH-3T3 細胞、ラット間葉系幹細胞を用い、エレクトロポレーション法により誘導体を細胞内に導入した。細胞毒性、細胞内における挙動、及び、細胞の *in vitro* 及び *in vivo* における MRI 撮像について検討した。

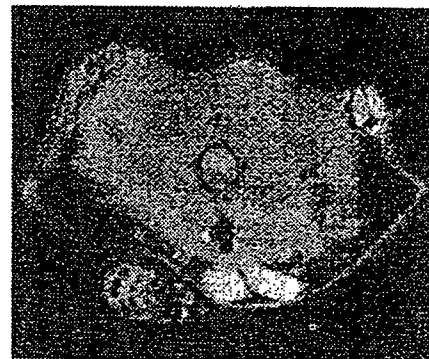


【結果及び考察】

得られた高分子造影剤水溶液の T1 測定を行った。任意の濃度に対して、 $1/T1$ をプロットしたところ、すべてのサンプルにおいて比例的な直線が得られた。この結果より緩和度を求めたところ、汎用性 MRI 造影剤であるマグネビストと同程度かそれ以上であることが明かとなった。さらに、wst-1 を用いた細胞毒性試験を行ったところ、得られた高分子造影剤の細胞毒性は、マグネビストより低いことが確認された。

次に、エレクトロポレーション法を用いて NIH-3T3 細胞内に高分子造影剤を導入した。導入後、蛍光顕微鏡により観察を行ったところ、細胞内で安定に存在していた。さらに、毒性及び細胞内滞在性について検討した。この結果、本高分子造影剤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、高分子造影剤は細胞内に安定に滞在することがわかった。つまり、本高分子造影剤は細胞に対してほとんど影響を与えないといえる。ラット間葉系幹細胞においても、高分子造影剤は細胞内に長期間、安定に存在することがわかった。

次に、MRI を用いて、高分子造影剤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、ラットの皮下に高分子造影剤導入細胞を移植し、*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)。本造影剤は、細胞内滞在性を有する、細胞のターゲットを可能にする新規 MRI 用高分子造影剤として有用であり、移植細胞の *in vivo* トラッキングを可能にすると期待できる。



高分子造影剤を内包した細胞の *in vivo* イメージング

5) 機能性幹細胞高純度分離とその分化能評価

(国立循環器病センター研究所・生体工学部) ○馬原 淳・山岡 哲二

e-mail : yamtet@ri.ncvc.go.jp

電話 : 06-6833-5012 (内線 2637) FAX : 06-6835-5476

【緒言】

機能性幹細胞を用いた細胞移植法は、組織再生治療を実現化するために最も有力な手法として着目されており、虚血性心疾患に対する治療効果も報告されている¹。このような幹細胞は、Ficoll 法により単離された単核球画分や、骨髄細胞に含まれる接着細胞画分に多く含まれており²、その分化能や細胞移植による治療効果について数多く検討されている。しかし、この細胞ポピュレーションには、幹細胞成分以外にもさまざまな種類の細胞が混在しており、テラトーマの形成や、目的以外の組織細胞へ分化する可能性を含んでいる。さらに体性幹細胞の出現頻度は極めて少なく、移植する幹細胞成分を高純度で分離することは、細胞移植治療効果の向上のみならず細胞バリデーションにおいても重要な課題となる。

そこで本研究では、細胞分化過程と相関が高い細胞表面マーカー密度に着目し、細胞を表面マーカー密度により高速で分離する細胞分離カラムシステムを開発している。本システムでは、平面基板上に抗体を高密度で配列した抗体固定化基板を細胞が連続的にローリングすることにより、細胞表面マーカーと固定化リガンドとの連続的な脱着反応を誘起する。この連続的な脱着反応により目的の表面マーカーとその密度を有する細胞ポピュレーションを分離する手法である。発表では、抗体固定化基板の作製、ならびに本カラムを用いた場合の間葉系幹細胞の溶出挙動について検討し、その分化能力について評価した。

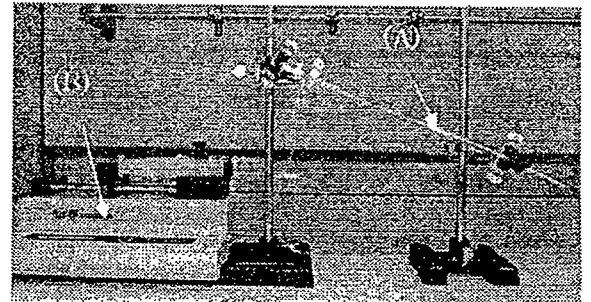


Figure 1 Photograph of the cell separation system on antibody immobilized column(A) with syringe pump(B).

【実験】

1. 細胞分離カラムの作製

オゾン酸化 (オゾン流量=5NI/h, 4時間) したシリコンチューブ (内径 0.5mm) を、10% アクリル酸/メタノール溶液に浸し、脱気後 60°C に加熱することでシリコンチューブ内腔にポリアクリル酸のグラフト鎖を導入した。その後、カルボジイミドによりポリアクリル酸のカルボン酸基を活性化させ抗マウス CD34 抗体を固定化した。固定化量についてはペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体を用いて定量した。

2. マウス由来間葉系幹細胞の採取

8週齢の C57BL/6 マウスから大腿骨を採取し、24G のカテラン針によるフラッシュにより骨髄細胞を採取した。得られた細胞を培養皿へ播種し接着した細胞成分を間葉系幹細胞として実験で使用した。

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

国立循環器病センター研究所・大阪工業大学大学院

○山本敬介・馬原淳・平野義明・山岡哲二

1. 緒言

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行かないために、組織が壊死してしまうという問題が生じる。そこで、酸素や栄養をスキューホールド内部にまで供給できるバイオリアクター装置の開発が試みられている。我々は、これまでに、灌流型バイオリアクターを用いた三次元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附着させ、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。しかし、プラスミドのみでは、遺伝子導入効率は極めて低い。そこで、新たに疎水化ポリカチオンキャリアーを設計した。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。

2. 実験

初めに灌流型バイオリアクター内で用いる足場として 2wt% 中空ポリ乳酸スキューホールドを作製した。10 μ 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(DMAPAA46-co-MPC53-co-stearylacrylate1)

(S-polymer) を用いて、アニオンとカチオンの比が 1:12 になるようにスキューホールドに対してコートを行った。また、プラスミド VEGF をコートしたもの、および、未コートのポリ乳酸スキューホールドも用意した。図 1 に示す灌流型バイオリアクター装置に、上記の各スキューホールドを取り付け、これに平滑筋細胞 2.0×10^6 個/mL の懸濁液を $1.1 \text{ mL/cm}^2 \text{ min}$ の灌流速度で播種し、24 時間後、 $4.0 \text{ mL/cm}^2 \text{ min}$ の灌流速度で 48 時間培養を行った。その後、ポリ乳酸スキュー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、リアルタイム PCR を用いて VEGF の発現量の解析を行った。

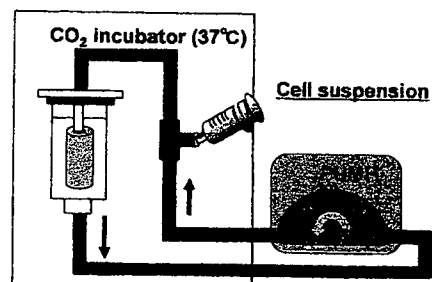


図 1 灌流型バイオリアクター装置

3. 結果と考察

pVEGF のみをコートしたものと pVEGF と S-polymer をコートしたものを比較すると、後者において VEGF が高効率で発現することが RT-PCR で確認された。また、S-polymer の共重合組成にも遺伝子発現効率が大きく影響されることも明らかとなった。この事は、DNA 結合ユニットである DMAPAA と親水化ユニットである MPC、および、疎水性ユニットである stearylacrylate のバランスに基づくキャリアーの物理化学的的特性の重要性を示唆している。さらに、灌流下での優れた発現効率が確認され、バイオリアクターと増殖因子遺伝子の利用による組織再生の有用性が示された。

参考文献

[1] Jang JH, Rives CB, Shea LD. et al. Mol Ther. 2005, 12(3), 475-8

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

Keisuke YAMAMOTO^{1,2}, Atsushi MAHARA¹, Yoshiaki HIRANO², and Tetsuji YAMAOKA¹ (¹National Cardiovascular Center, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan ²Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi Ward, Osaka City, Osaka Prefecture 535-8585, Japan)

¹Tel: 06-6833-5004 (2637) Fax: 06-6835-5476 E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

MRIによる移植細胞の *in vivo* 追跡技術

国立循環器病センター研究所 生体工学部¹⁾・放射線医学部²⁾

山岡哲二¹⁾、橘 洋一¹⁾、圓見純一郎²⁾、飯田秀博²⁾

【緒言】細胞移植治療の良好な効果が報告されているが、その治癒メカニズムの解明が進んでいないなど、細胞移植療法が一般的な治療法となるには問題点が多い。これまで、移植された細胞や組織の分布状態や生着率を低侵襲的に評価する技術がなく、そのために、細胞移植と回復過程との真の相関性を経時的かつ定量的に解析することはできなかった。そこで、細胞追跡用MRI(Magnetic Resonance Imaging)造影剤として、細胞膜非透過性の高分子キャリアーにMRI用造影剤を導入した高分子-造影剤コンジュゲートを開発した。

【実験】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。モデル細胞としてNIH-3T3細胞に対して細胞ラベル化用造影剤を導入し、細胞内細胞内滞留性、細胞毒性、および、MRI造影効率を評価した。

【結果と考察】得られたコンジュゲートの細胞毒性は極めて低く、また、細胞の増殖を抑制することなく細胞質内に長期に亘って滞留できることが明らかとなった。さらに、T1測定を行ったところ、汎用性MRI造影剤であるマグネビストを凌ぐ造影効率が得られた。細胞内の限られた自由水であっても*in vivo*造影効果が確認されたことより、本造影剤は、長期にわたって移植細胞を追跡できる初の技術であることが証明された。

連絡先

TEL : 06-6833-5012(内線 2637)

FAX : 06-6835-5476

E-mail : yamtet@ri.ncvc.go.jp

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

Miskon A.^{1,3}, Terada D.², Ehashi T.², Fujisato T.², Mahara A.¹, Uyama H.³, Yamaoka T.¹

¹Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Japan

²Department of Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Japan

³Department of Chemical Engineering, Osaka University, Japan

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

antibody-immobilized column, delayed fractions were observed, suggested that the MSCs were separated by the marker-antibody specific rolling mechanism. Next, the purified fractions were incubated with the osteoblastic differentiation medium for 4 days. In this condition, the expression of specific genes related to the differentiation was increased 10 to 5-fold compared with unpurified MSCs. These results suggested that MSCs were purified using the column in about 10 min and the purified MSC fraction was composed of the pure population with a high potential for the differentiation.

(124) Differentiation Property of Mesenchymal Stem Cells Isolated by Ligand-Immobilized Column System

Mahara A., Yamaoka T.

National Cardiovascular Center Research Institute, Advanced Medical Engineering Center, Department of Biomedical Engineering, Suita, Osaka, Japan

Mesenchymal stem cells (MSCs) have multipotent and proliferative activity. In many cases, MSCs were separated by FACS system based on the presence of the specific surface marker. However, the density of surface marker is well known to be dramatically changed with developmental stage and its differentiation property. In this study, we focused on its density for preparing the highly purified MSCs. To isolate an MSC population which has homogenous density of the surface marker, the novel ligand-immobilized column systems were designed and established. The injected cells rolled on the inner surface under a medium flow condition like a rolling adhesion phenomenon of the leukocytes in the blood vessel.

AntiCD34 antibody was immobilized on the flat surface of the column at the density of $200 \mu\text{g}/\text{m}^2$. Roughly purified MSCs were prepared from a bone marrow of C57BL/6 mouse by the conventional method. Only when the MSCs were injected into the