

高圧印加処理を用いて作成した脱細胞化角膜の臨床応用に向けた試み
 - 高次構造の組織反応に及ぼす影響を中心に -

ヒューマンサイエンス振興財団¹・物材機構生体セ²・東医歯大生材研³
 東医歯大眼科⁴・阪工大院工⁵
 ○服部晋也^{1,2}・船本誠一³・橋本良秀³・木村剛³・佐々木秀次⁴・望月學⁴
 本田貴子^{1,2}・藤里俊哉⁵・岸田晶夫³・小林尚俊²

[緒言] 角膜実質部の精密なコラーゲン線維束の組織構造は角膜の透明性に深く関与するため、角膜実質再生を目指す材料には正常角膜実質が持つ複雑な構造に類似した構造を有することが望ましい。我々は一般的な界面活性剤を用いた脱細胞化よりも生体にとって安全な超高静水圧印加処理 (UHP) による脱細胞化組織の作成に成功した¹⁾。この方法で脱細胞化した角膜は処理後の組織構造変化が界面活性剤で脱細胞したものよりも抑えられていることが微細構造の調査により判明した。本研究では、UHPにより作成した脱細胞化角膜を、角膜上皮を欠損させたウサギ角膜に移植することにより、高次構造を維持した脱細胞化角膜が組織再生反応に与える影響を調査した。

[実験] プタの眼球より角膜を採取し、洗浄後、冷間等方加圧装置 (神戸製鋼、神戸) を用いて、10°Cにおいて10000気圧の超高圧印加処理を10分間行った後、直ちにDNase I、デキストランおよび抗生物質を含むEGM-2培地にて37°C、72時間、振盪洗浄を行った。得られた脱細胞角膜は、ウサギ角膜上皮に直径2mmの上皮欠損を作成し、その下部の角膜実質に直径6mmの脱細胞化角膜を移植する実験を行い術後の経時観察を行うとともに術後6ヶ月における組織学的な評価を行った。なお上皮の再生状況を確認するためにフローレス試験紙 (昭和薬品化工、東京) を用いて観察した。

[結果と考察] 移植手術を行った3検体のうち2羽においては、術後の移植体内への血管侵入など顕著な炎症反応を認めず、術後2週の段階で上皮欠損部位は新生上皮組織によって覆われた。術後8週の段階では移植した脱細胞化角膜はほぼ透明になっていた。術後6ヶ月においても、周辺組織に炎症などの反応は見られず、正常組織に近い組織構造を呈していた。残りの血管侵入が生じた検体においても、術後6ヶ月までに血管が完全に消退することはなかったが、グラフト内の血管進入部以外の部位では経時的な透明性の回復を認め、術後6ヶ月においてはわずかに残存している血管侵入部以外は非常に高い透明性を示していた。これらの結果から、UHPを用いて作成した高次の組織構造が保たれた脱細胞化角膜は術後早期より材料上への上皮組織再生、透明性の回復が達成でき、且つ術後その再生組織が維持されることが示され、臨床応用可能な材料である可能性が示唆された。

この研究は厚生労働省科学研究費補助金により行われた。

[1] Fujisato T. et al. Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. 2005.

Evaluation of decellularized cornea prepared by ultra-high hydrostatic pressure for clinical use . -Influence of the higher order structure to histological responses-

Shinya HATTORI^{1,2}, Seiichi FUNAMOTO³, Yoshihide HASHIMOTO³, Tsuyoshi KIMURA³, Shuji SASAKI⁴, Manabu MOCHIZUKI⁴, Takako HONDA^{1,2}, Toshiya FUJISATO⁵, Akio KISHIDA³, Hisatoshi KOBAYASHI²
 (¹Japan health sciences foundation, 13-4 Kodenma-cho, Chuo-ku, Tokyo, JAPAN, ²Biomaterials center, National Institute for Materials Science, 1-2-1 Sengen, Tsukuba, Ibaraki, JAPAN, ³Institute for biomaterials and bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Chuo-ku, Tokyo Japan, ⁴Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo, Tokyo, Japan, ⁵Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Akashi, Osaka, Japan)

²Tel: +81-29-860-4495, Fax: +81-29-860-4715, E-mail: KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp

Key Word: Artificial cornea, decellularized tissue, ultra-high hydrostatic pressure

Abstract: Using ultra-high hydrostatic pressure, decellularization of cornea was accomplished with low structural deformation rather than detergent decellularization. This material may be a good scaffold for corneal stroma. In this study, we evaluate the influence of the higher order structure to histological responses using animal implantation model.

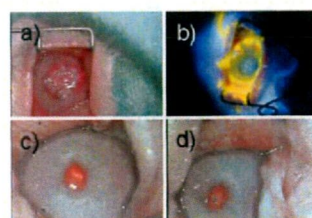


Figure 1 Gross observation of operated animals
 1 Immediately after operation
 2 Two weeks after operation
 3 Eight weeks after operation
 4 45 months after operation

種々の超高压脱細胞化組織上での細胞培養と細胞機能解析

東医歯大生材研¹・大工大生医工²・物材生体セ³○木村剛^{1,3}・橋本良秀^{1,3}・船本誠一^{1,3}・南広祐¹・藤里俊哉²・小林尚俊³・岸田晶夫^{1,3}

【緒言】細胞の足場となるスキャフォールドの調製には、コラーゲンやポリ乳酸などの高分子を3次元にビルドアップする手法と生体由来組織から細胞のみを除去した残存マトリックス（脱細胞化組織）を用いる方法がある。我々は、脱細胞化組織が生体特有の微小環境を有する点に着目し、超高压印加により細胞を破壊し洗浄により残渣を除去する超高压脱細胞化法を開発した。本手法は、従来の界面活性剤洗浄法に比して細胞毒性が低く、また、細胞外マトリックスの変性抑制が可能である。本研究では、種々の超高压脱細胞化組織（骨・骨髄、角膜、血管）での細胞培養と細胞機能解析を行った。

【実験】生体ブタ由来の大腿骨・骨髄、角膜、大動脈を用い、超高压処理（10000気圧、15分間）を施した後、所定時間の洗浄処理により脱細胞化組織を得た。また、界面活性剤洗浄法によっても脱細胞化組織を調製した。得られた脱細胞化組織のヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色、SEM観察、DNA定量により脱細胞化を確認した。脱細胞化組織上に様々な細胞（MC3TC-E1、HUVEC、ラット由来骨髄細胞、神経細胞など）を播種し、ギムザ染色、SEM観察、顕微鏡観察により細胞形態、細胞接着性を評価し、DNA定量により細胞増殖性を評価した。

【結果】超高压脱細胞化法では、いずれの組織においても、超高压印加条件・洗浄条件を最適化することで生体構造を維持した脱細胞化が可能であった。一方、界面活性剤洗浄法では、十分に脱細胞化されない組織、脱細胞化されても生体構造が維持されない組織があった。得られた脱細胞化組織への細胞播種では、いずれの超高压脱細胞化組織においても良好な細胞接着が確認できた。一例として、超高压脱細胞化血管の内皮側にHUVECの播種した場合、ギムザ染色、H-E染色、SEM観察により血管内皮側の表面全面への単層状態での接着と増殖が確認できた。一方、界面活性剤法では、十分に細胞が接着されない場合や細胞毒性が示される場合があり、残存した界面活性剤が細胞接着に影響したと考えられる。細胞の増殖性については、用いる脱細胞化組織と細胞との組み合わせによって異なる増殖挙動が示された。また、脱細胞化法の違いによっても細胞増殖挙動に違いが示された。細胞分化については、培養シャーレ上での分化誘導に比して、超高压脱細胞化組織上における効率良い分化が示される場合もあった。以上の結果について、詳細に発表する。

【謝辞】本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金の助成を受けて行われた。

Cell culture on various decellularized tissues prepared by ultra-high hydrostatic pressure processing

Tsuyoshi KIMURA^{1,3}, Yoshihide HASHIMOTO¹, Seiichi FUNAMOTO^{1,3}, Kwangwoo NAM¹, Hisatoshi KOBAYASHI³, Toshiya FUJISATO² and Akio KISHIDA¹.

(¹ Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan, ² Osaka Institute of Technology, ³ National Institute for Materials Science), Tel: 03-5280-8029, Fax: 03-5280-8028, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Words: decellularized tissue / high pressure / cell culture

Abstract: Various tissues, such as bone/bone marrow, cornea and vessel, were decellularized by ultra-high hydrostatic pressure treatment. The decellularization of them was confirmed by H-E staining, SEM observation and DNA quantification. The several cultured cells, such as MC3TC-E1, HUVEC, rat BMC and NSC, were seeded on the decellularized tissues. The cellular functions, such as adhesive, proliferation and differentiation, were investigated.

生体組織の特性を有するコラーゲンマトリクスの創製

(東京医歯大生材研、JST-CREST)○南 広祐^{1,2}、船本 誠一¹、木村 剛^{1,2}、岸田 晶夫^{1,2}

E-mail: bloodnam_fm@tmd.ac.jp

TEL: 03-5280-8156 FAX: 03-5280-8028

【結論】 バイオマテリアルとして広く用いられているコラーゲンは人体組織の基本構成物質であり、優れた生物学的特性を有するため、種々な形で作製され人工臓器および組織工学分野で応用された。しかし、角膜、腱、心膜など、まだ、コラーゲンをを用いて達成できていない構造体がある。その理由はコラーゲン特有の性質、分子間架橋構造の制御の不能にある。本研究では、生体組織と同じ物理的・生物学的機能を再現させ、人工臓器および組織工学分野で応用可能な新規バイオマテリアルを設計するために細胞外マトリクスの構造と表面特性に注目した。細胞外マトリクス構造は生体内での微小環境を構成する最も重要な要素であり、材料の生体組織構造や表面特性は生物学的機能と関連性があると報告されている[1,2]。

本研究グループでは、生体組織と同じ物理的・生物学的機能の再現を目的とし、Figure 1 に示したような水溶液中での塩とグリコサミノグリカンによるコラーゲン線維化 (fibrillogenesis) を利用し[3]、細胞外マトリクスと類似構造を有するコラーゲン構造体を作製した。本研究では、コラーゲン構造体を用いて、コラーゲン構造と物理的特性-生物学的特性の関係性に調べ、生体組織の機能を有するコラーゲンマトリクスを、再現性よく使用目的に合致させた新規人工組織体として応用可能性を検討した。

【実験】 コラーゲン 0.5wt%と 2wt%水溶液を用意し、透析カセットの中に注入(3mL)した後、4°CでNaCl/Na₂HPO₄水溶液に入れ、反応させた。24 時間後、透析カセットを水で安定させた後(37°C)、コラーゲン構造体を透析カセットから出し、コラーゲン構造体(F-Coll)を得た。より緻密な構造を有するコラーゲン構造体を得るため、F-Collを48時間自然乾燥させた後、蒸留水で洗浄し、薄い膜のようなコラーゲン構造体(T-Coll)を得た。コラーゲン構造体と比べるために、コラーゲン2wt%水溶液から作製したコラーゲンフィルムをpH7.4の水溶液に入れ、24時間安定させた(コラーゲングル)。また、架橋されたコラーゲングルを作製するために、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC)とN-hydroxysuccinimide (NHS)を用いてコラーゲンフィルムを架橋した(ENゲル)[4]。コラーゲン構造体、コラーゲングル、そしてENゲルを用いて表面特性、物理的特性と生物学的特性を調べた。

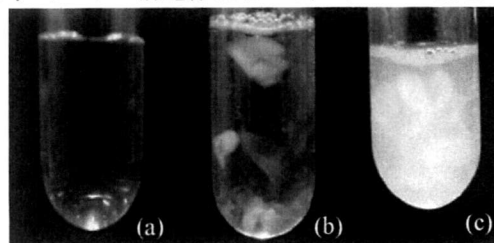


Figure 1. The collagen aqueous solution (a) and fibrillized collagen aqueous solutions in (b) NaCl/Na₂HPO₄ aqueous solution and (c) heparin aqueous solution.

Preparation of collagen matrix possessing properties of native tissue

Kwangwoo NAM^{1,2}, Seiichi Funamoto¹, Tsuyoshi KIMURA^{1,2}, and Akio KISHIDA^{1,2}(¹Division of Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²JST-CREST)

TEL: 03-5280-8156 FAX: 03-5280-8029 E-mail: bloodnam_fm@tmd.ac.jp

Key Word: collagen / elasticity / in vivo study

Abstract: To prepare an artificial extracellular matrix (ECM) which possesses the same physical and biological properties as that of native ECM, we executed fibrillogenesis of collagen molecules in NaCl and Na₂HPO₄ aqueous solution using dialysis cassette. The resulting collagen matrix was composed of microfibrils with regulated D-periodicity. The Young's modulus was shown to be much tougher than that of conventional collagen gel, which is consists of triple helix aggregates. The in vivo study using subcutaneous implanted to rats showed that the collagen matrix would be bioinert, while the conventional collagen gel showed high degree of inflammatory response. These results imply that it is possible to control the physical and biological properties of collagen matrix by mimicking the native tissue structure via fibrillogenesis.

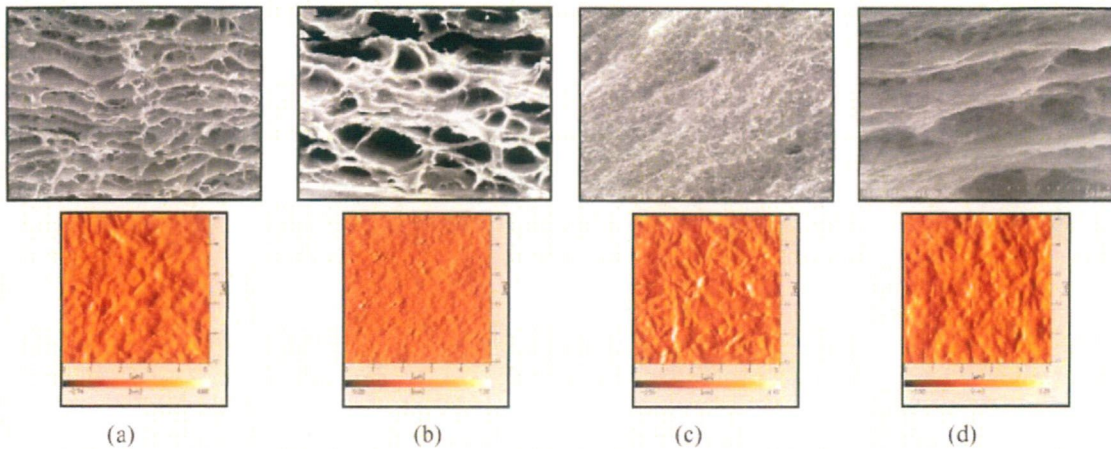


Figure 2. SEM images and AFM images of (a) native tissue, (b) collagen gel, (c) F-Coll, and (d) T-Coll.

コラーゲン構造体の構造観察は、走査型電子顕微鏡 (SEM) ー原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて行った。コラーゲン構造体の膨潤度、収縮挙動、コラーゲナーゼによる生分解性を測定し、コラーゲンゲルと EN ゲルと比較した。また、機械的な物性を測定するために、引張試験機を用いて T-Coll、コラーゲンゲル、そして EN ゲル粘単性とヤング率を測定した。コラーゲン構造体とコラーゲンゲル炎症反応を調べるために、コラーゲン構造体をラットに移植 2 週間と 8 週間の生体反応を観察した。

【結果と考察】 本研究グループで作製された F-Coll は水溶液で安定であり、加水分解することもなかった。表面はコラーゲン線維で構成されており (Figure 2)、AFM で確認した結果、フィブリルバンドが観察された。これは、NaCl と Na₂HPO₄ にとる自己組織化の影響である。また、HCl が除去され、ゲル化するため、体組織と類維構造を有する安定なコラーゲン構造体が得られる。

T-Coll は F-Coll と比べ、緻密な繊維構造を有するため、低膨潤度を有する。フィブリルバンドも維持されており、乾燥による変性は見られなかった (Figure 2(d))。機械的物性を測定した結果、高い機械的物性と粘単性を同時に有することが分かった。コラーゲンゲルの場合、低機械的物性と粘単性を有する。また、EN ゲルの場合、コラーゲンゲルと比較し、高い機械的物性を有しているものの、架橋効果により粘単性を失う。これは、緻密なコラーゲン線維化による効課であり、また、低膨潤度を有するためであると考えられる

F-Coll と T-Coll の動物移植実験結果、コラーゲンゲルの場合、炎症反応が確認されたものの (Figure 3(b))、生体組織と F-Coll、T-Coll では炎症反応が確認されていなかった (Figure 3(a),(c),(d))。また、T-Coll を移植した場合、カプセル化とマトリクスの分解が抑えられることも発見した。これは、コラーゲン構造に起因すると考えられ、3 次構造と 4 次構造制御により、生体反応をコントロールが可能であることを示唆しているとともに、生体組織類似構造を作製することにより、生体組織と近い物理的特性と生物学特性を発現させることが可能であると考えられる。

【謝辞】 本研究の一部は、この研究は独立行政法人科学技術振興機構、CREST の補助を受けて行われた。

【参考文献】 [1] R. Warren Sands and D.J. Mooney, *Curr. Opin. Biotech.* 2007, **18**, 448. [2] C. Yip, *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2002, **961**, 109. [3] J. Gross and D. Kirk, *J. Biol. Chem.* 1958, **233**, 355. [4] K. Nam et al., *Acta Biomater.* In press.

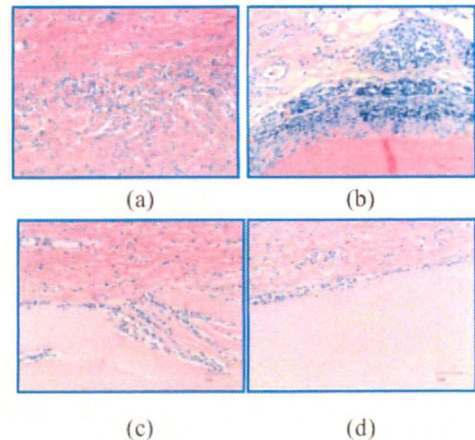


Figure 3. H-E stained histological images of (a) cornea, (b) collagen gel, (c) F-coll, and (d) T-Coll after 8 weeks.

高分子ナノファイバーを基盤とした角膜実質再生用足場材料

物材機構¹, ヒューマンサイエンス振興財団², 東京医科歯科生材研³, 東京医科歯科眼科⁴, 大工大院工⁵,
 ○小林尚俊¹, 服部晋也², 本田貴子², 船本誠一³, 佐々木秀次⁴, 橋本良秀³, 藤里俊哉⁵, 寺田堂彦¹, 木村
 剛³, 望月學⁴, 岸田晶夫³

【緒言】 角膜が受傷したとき、角膜機能は代替角膜を使用して回復することができる。現在の治療における第一選択は角膜移植である。しかし、日本では、毎年施行される角膜移植の数は2000を下回る程度であり、慢性的なドナー不足の状態が続いており、未治療患者を角膜疾患に由来する失明から救うためには、信頼性の高い代替角膜の開発が望まれている。これまで開発されてきた人工角膜は、PMMA、ポリカーボネート、シリコン、PHEMA、PVAなどの合成高分子をレンズ状に成形してその辺縁部位に組織との固着を確保する多孔体等を具備する形状のデバイスが開発され一部臨床に使用されている。しかし、長期的な生体適合性が不十分で術後数年のうちに組織からの脱落、感染等の問題が発生するケースが散見されるのが現状である。角膜の生理を考えると、物質の透過性に制約を持つこのような材料系での長期安定に機能するデバイスの創生にはパラダイムシフトが必要である。この背景に基づき、組織再生技術を基盤としたハイブリッド型の人工角膜の開発の試みや角膜再生の試みがなされることとなったが、未だ信頼できるデバイス及び技術の開発には至っていない。

角膜は透明な無血管組織で、上皮、ボーマン膜、実質、デスメ膜、内皮から構成される視覚に特化したユニークなナノ・マイクロ構造を有している。角膜全体の厚みの約95%を占める実質は、コラーゲン繊維、ルーミカンに代表される糖タンパク質、角膜実質細胞から主に構成され、数十ミクロンの厚みの層が積層された構造体である。同一層内のコラーゲン繊維は高度に配向し、隣接層の間ではコラーゲン繊維の方向は直交するような特殊な高次構造を持ち、この構造があたかも光の回折格子の如く振舞うため角膜は透明であると考えられている。角膜代替物の開発を考えると、生体内部に長期安定に存在でき、材料の透明性と眼圧に抗する機械的な強さを得るためには、角膜のもつナノ・マイクロ構造を模倣することがひとつの選択肢となる。我々は、現在ボトムアップ手法(ナノファイバーの高次構造化)とトップダウン的な手法(高次構造を維持したまま生体角膜の細胞成分を除去して作製する手

Nanofiber based-scaffolds for corneal stromal regeneration

Hisatoshi KOBAYASHI¹, Shinya Hatton², Takako Honda², Tsuyoshi Kimura³, Seiichi Funamoto³, Yoshihide Hashimoto³, Akio Kishida³, Shunji Sasaki⁴, Manabu Mochizuki⁴, Toshiya Fujisato⁵ (¹Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-2-1, Sengen, Tsukuba, Ibaraki 305-0047, Japan ²Japan Health Sciences Foundation, ³Institute of Biomaterials and Bioengineering, ⁴Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, ⁵Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology)

Tel: +81-29-860-4495, Fax: +81-29-859-2247, E-mail: KOBAYASHI.Hisatoshi@nims.go.jp

Key Word: Nanofiber/Nanocomposite/Sponge/Scaffold/Vascularization

Abstract: In general, living body is constructed by various nanomaterials under the precisely controlled condition. Therefore, we believe the best way to achieve the longtime biocompatibility of the medical devices would be mimic the living bodies feature. Nanofibers mimics for natural ECM made from biocompatible polymers seem to have good potential to apply medical area. From this consequence, we are aiming to develop reliable artificial stroma constructed from nanofibers. Top down approach(Natural corneal based scaffolds) and bottom up approach(build up from nanofibers) are under investigation. In this talk, the importance of the 3D structure constructed from nanofibers will be discussed using the recent outcome of the both trials.

法) 双方から信頼性の高い角膜代替材料の開発を行なっている。本報では、それぞれの研究から得られた実験事実に基づき、代替角膜として使用される材料の具備すべき特性を討論する。

【実験】

1) ボトムアップ的材料開発: ナノファイバーからの組上げ型で角膜類似構造を作り上げるため、電界紡糸法を利用してPVA ナノファイバーを調整し、その後の実験に供した。ナノファイバーの調整法: PVAサンプルは、PVA(重合度 2000、鹸化度 99.5%)5%水溶液を用い、エレクトロスピンニング法(電圧: 25kV、送液量 10mL/hour、電極間距離 25cm)を用いてシートを作製した。コレクター部分を工夫することでランダム不織布と繊維配向を有するシートを作製した。PVAナノファイバーへのコラーゲン固定化反応は文献1、2に従った。

2) トップダウン的材料開発: 生体角膜に類似した物性と構造を有する脱細胞化角膜組織を作製した。作製法: 成体ブタ角膜を 3.5% w/v Dextran を含む PBS (DEX/PBS) で洗浄した後、冷間等方加圧装置, Dr. CHEF ((株)神戸製鋼所)を用い、10℃または 30℃にて 10,000 気圧の超高压印加処理 (UHP) を 10 分間行った後、直ちに 3.5% w/v Dextran、0.2 mg/ml DNase I を含む洗浄培地 (DEX/EBM) による振盪洗浄を 72 時間行い、細胞残渣を除去し作製した。

3) 細胞接着、増殖、分化、組織反応に関する検討: 家兎角膜上皮細胞及び実質様細胞を用いた。接着、増殖試験に関しては、上皮細胞、実質細胞をサンプルに播種し ($4-6 \times 10^4$ cells/well) その付着、増殖状態を組織学的に検討した。また、上皮の分化能を2週間後のエアリフトカルチャーにて確認した。また、脱細胞化角膜に関しては、家兎への埋入を行い経時的变化を観察した。

【結果及び考察】

PVAナノファイバー材料特性の検討結果: コンタクトレンズに使用されるような通常のゲル構造体に比較すると、ファイバー高次構造体では間隙が大きいため物質の透過性が向上した。このため、栄養成分や水分の供給阻害が起こらず角膜のデシケーションなどを起こすリスクが低く、長期安定的に生体で機能する可能性が示された。光学特性: ランダムな構造を持つ不織布より配向構造を持つシートが光の散乱を抑制した結果可視光の透過性が高くなった。今回使用したPVAのファイバー径は数百ナノメートルと比較的太いため、未だ実用域に達す透明性は確保されていない。更なるファイバーの細線化と構造の均一化を図る必要がある。配向シート上に播種した実質細胞は、繊維配向の向きに伸展、配列した接着する様子が観察され、角膜を模倣したシートの積層構造を作製して1ヶ月の培養を行なった後も積層構造内の実質細胞の生存が確認され、PVAナノファイバーと細胞を組み合わせるハイブリッドタイプの角膜実質の可能性が示唆されている。PVAナノファイバーシート上へは、角膜上皮細胞の良好な接着、増殖も確認されるとともにエアリフトによる分化誘導の結果、多層上皮化が達成された。一方、脱細胞化角膜組織では、TEM観察の結果、超高压処理を行なった後も角膜の高次構造は良く維持されていた。家兎角膜内への試料埋入を行なった結果、角膜内皮細胞の脱水機能の正常化に伴い、白濁していた組織が透明化することが確認された。この結果は、角膜の積層高次化構造を維持することの重要性を証明する結果と考えられる。ボトムアップ的であれトップダウン的であれ、角膜組織の持つ高次構造を模倣した材料、デバイス設計の重要性が示された。

【謝辞】本研究は、文部科学省科研費補助金および厚生労働省科研費補助金の業務の一環として行われた。

1) H.Kobayashi, M.Kato, T.Taguchi, et al., Mater. Sci. & Eng., C, 24, (2004), p729-735

2) H.Miyashita, S.Shimmura, H.Kobayashi, et al., J.Biomed.Mater.Res, B, 76, (2006), p56-63

〔脱細胞組織等の生体由来人工臓器の基礎と現状〕

PD1-1 「脱細胞化組織等の生体由来人工臓器の基礎と現状」について

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

岸田品夫

第48回日本人工臓器学会大会に表記のパネルディスカッションが設定され、5件の講演が予定されている。本パネルディスカッションの背景について述べる。これまで、人工臓器を構成する材料は、金属、セラミックス、高分子の3材料がほとんどであり、生体由来材料としてはコラーゲンやゼラチンがわずかに用いられていた。1980年代にハイブリッド人工臓器の概念が提出され、人工血管や人工関節などにタンパク質や細胞を組み合わせる研究が多数行われ、生体由来材料の応用が広く認知されるきっかけとなった。1992年に組織工学・再生医療の概念が提出され、足場材料としてポリ乳酸をはじめとする生分解性材料が脚光を浴びた。コラーゲンも、生分解性材料の細胞接着性向上のため、あるいはそれ自身によるマトリクスが組織再生用足場材料として広く研究されてきた。近年ではiPS細胞の登場により、再生医療の興味の中心は「細胞」に移っているが、3次元組織の構築や大型臓器の再建など、足場材料の重要性も増している。特に、生分解性材料の応用には、例えば機能発現までの期間が必要、分解産物の影響など、一定の限界があることが明らかになるにつれ、生体組織の優れた機能をどこまでトレースできるかに関心が移っている。さらに、人工臓器を用いた治療を補完する再生医療、あるいは人工臓器とのハイブリッド再生医療など、新しい概念も生まれつつある。このような状況の中で、生体組織そのものの機能に着目し、新しい人工臓器の開発あるいは人工臓器治療との連携を考える研究が行われている。本パネルディスカッションでは、脱細胞化組織、生体内再建組織などのレシピエントの細胞による組織構築法、および異種動物の生体組織の応用を目指した免疫隔離技術、遺伝子組み換えブタによる異種臓器移植について、最新の研究成果を紹介していただく。生体由来の材料・細胞・組織を用いた人工臓器の現状を紹介し、今後の再生医療や人工臓器医療へのフィードバックを考えたい。

PD1-2 界面活性剤フリーの脱細胞弁・血管の臨床化に向けて

¹ 国立循環器病センター心臓血管外科、² 大阪工業大学大学院、

³ 東京医科歯科大学生体材料工学研究所、

⁴ 国立循環器病センター研究所生体工学部

漆谷謙司¹⁾、藤里俊哉²⁾、岸田品夫³⁾、山岡哲二⁴⁾

我が国では年間約2万件の冠動脈バイパス術、約1万件の心臓弁置換術が施行されている。また、閉塞性血栓血管炎等によって、約5千人が下肢切断を余儀なくされており、1万件弱の末梢血管再建術が施行されている。不全あるいは傷害を受けた組織を置換するためには、自己組織や凍結保存同種組織の使用が好まれ、米国では年間数千件もの同種組織が使用されている。しかし我が国では、同種組織の提供は年間数十件程度に留まっており、圧倒的に不足しているのが現状である。一方、先天性疾患を抱える小児患者では、特有の早期石灰化に加えて移植組織の成長性欠如のため、同種組織でも複数回の移植が避けられない。これらの問題を解決するため、移植後におけるホストの細胞浸潤による自己組織の再構築を期待し、生体吸収性材料を用いた再生型血管や、脱細胞化組織を用いた再生型心臓弁の臨床応用が始まりつつある。脱細胞組織は、生体の血管構造自体を利用するため、生体力学特性が生体に近く、弓部や分岐部などの複雑な構造も容易に作成することができる。我々は、超高静水圧印加及びマイクロ波照射下洗浄を組み合わせた新規な細胞除去方法を開発した（特許登録4092397）、ミニブタから採取した心臓弁および血管から、コラーゲンを中心とした構造タンパク質の成分並びに構造のみを抽出した人工血管を開発してきた。本方法は、細胞除去効率が高く、処理後も生体力学特性が変化しない。さらに、他の脱細胞方法とは異なり、界面活性剤を用いていないために、移植後の周囲細胞の浸潤が活発で自己組織化に優れている。また、処理後の組織からは内在性レトロウイルスの除去もPCR法によって確認されており、全く感染性を示さず、高い安全性が担保される。これまでに、ブタ同種移植実験を重ね、12か月までの良好な機能保持および自己組織化を確認している。主に、高圧系において問題となる石灰化の問題も、処理方法の改善により大きく軽減するに至った。本講演では、脱細胞組織に関する、産業的および臨床的な国内外での状況を概説するとともに、国立循環器病センターにおいて、これまでに得られた成果について報告する。

パネルディスカッション

037 脱細胞化口径人工血管の調製

1) 東京医科歯科大学生体材料工学研究所、
2) 大阪工業大学工学部、3) 札幌医科大学第二外科

坂岸 淳¹⁾、船本誠一¹⁾、木村 剛¹⁾、藤里俊哉²⁾、
滝上哲哉³⁾、岸田晶夫¹⁾

【目的】狭心症や心筋梗塞などに対する有効な治療法である冠動脈バイパス手術は、日本では年間約2万件、米国では約50万件の手術が行われている。代替血管として自己血管が最も有用であるが、供給不足や患部以外の侵襲などの問題がある。また、中・大口径の高分子人工血管が用いられているが、サイズの不適合や閉塞などの問題がある。このことから、内径が6mm以下の小口径血管の開発が強く望まれており、これまで多くの研究、開発がなされているが未だ満足できるものはない。中・大口径に比べ、小口径血管には高い抗血栓性が要求され、このためには早期の内皮化が重要であると考えられている。最近生体由来組織から細胞除去し、残存する細胞外マトリクスである脱細胞化組織を移植材料として用いる手法が検討されている。我々のグループでは、超高圧印加により細胞を破壊し、洗浄により残渣を除去する超高圧脱細胞化法を開発し、中・大口径結果にて良好な内皮化が示されている。本研究では、超高圧脱細胞化法により脱細胞化した小口径血管を調製し、移植血管としての基礎検討を行った。

【方法】種々のブタ血管（頸動脈・胃大網動脈・橈骨動脈）を購入し、血管周囲の脂肪を除去し、血管分枝を結紮した。30℃にて、10000気圧の超高静水圧処理を10分間行った後、細胞残渣を洗浄し、脱細胞化小口径血管を調製した。脱細胞化組織の評価として、組織学的評価、力学試験による物性評価を行った。組織再生評価として、細胞接着試験を行い、脱細胞化小口径血管の応用可能性を検討した。

【結果と考察】超高静水圧印加法によりブタ血管からの細胞除去が可能であった。また、従来の界面活性剤法より高い細胞除去効率を有していることが確認された。組織学的評価では、脱細胞化処理による構造変化が抑制されていることが観察された。しかし、力学的評価より、脱細胞化による物性変化が認められたが、生体内での使用が可能な力学的強度を有していることが確認された。血管内皮細胞接着試験より、脱細胞化血管内腔への細胞接着が可能であることが示された。以上より、脱細胞化小口径血管の人工血管としての応用可能性が示唆された。

11月13日(金)
第5会場

23amO-4-5

脱細胞化神経を用いた損傷神経の再生○江橋 具¹⁾²⁾、西垣戸 麻美¹⁾³⁾、森反 俊幸³⁾、藤里 俊哉⁴⁾、山岡 哲二¹⁾²⁾¹⁾国立循環器病センター 研究所 生体工学部、²⁾JST-CREST、³⁾鈴鹿医療科学大学、⁴⁾大阪工業大学

神経欠損の治療に用いる長い自家神経の摘出は困難なため、ポリ乳酸などの神経誘導管の開発が進められてきた。一方、生体内の神経の構造が保持された脱細胞化神経は、再生に有効であると考えられているものの、いまだ臨床応用された例はない。本研究は、われわれがこれまでに心臓弁や血管の脱細胞化に用いてきた、超高圧印加処理法を神経に適用し、ラットの神経移植実験により有効性を評価することを目的とした。坐骨神経を摘出して PBS に浸漬し、980 MPa の圧力を与えて細胞を破壊した。続いて、細胞残渣除去のための洗浄工程を経て、脱細胞化神経とした。その後、脱細胞化評価と、ヒト他家移植を想定したラット同種異系統移植実験を行なった。坐骨神経の 10 mm 長の欠損部位に、作製した脱細胞化神経、またコントロールとして自家神経を移植した。神経再生の組織学的評価は、HE 染色やシュワン細胞の免疫染色で、機能評価は、移植部よりも遠位の筋群における筋電位測定により行なった。形態学的観察の結果、移植 5 ヶ月において、脱細胞化神経内にも、正常神経や自家移植神経とほぼ同様のシュワン細胞の配列が認められたものの、神経の機能的回復を示す筋電位は自家移植神経でしか計測されなかった。しかし、移植 8 ヶ月後には、脱細胞神経移植群でも筋電位が回復したことから、自家神経移植よりは時間がかかるものの、脱細胞化神経でも神経の再生の足場として利用できることが示唆された。

060 パターン化された有孔材料に対する生体応答の解析

¹⁾ 国立循環器病センター研究所生体工学部、²⁾ JST-CREST、

³⁾ 大阪工業大学工学部電子情報通信工学科

江橋 具^{1,2)}、白井 航³⁾、多嶋佑介³⁾、神村共住³⁾、
山岡哲二^{1,2)}

【緒言】多孔質スキャフォールドを移植すると、複雑な生体応答がおこり、その経時的変遷とともに組織の再生が進行する。この生体応答は、一般的に、浸潤細胞の同定、サイトカインの解析、さらには、被覆化組織の観察などにより判別されてきたが、のちの組織再生との相関は明らかにされていない。我々は、移植初期に材料近傍で起こる生体応答と、将来的な組織再生との相関を解明するため、材料皮下移植実験での組織学的・遺伝子学的な評価を行ってきた。本研究では、レーザー加工技術を用いて孔径や配列がパターン化された有孔材料を作製し、それら材料の物理化学的表面特性およびその形状が生体応答に及ぼす影響を検討した。

【実験方法】表面特性の異なる材料として、約 300 μm 厚のポリエチレン、ポリ乳酸 (PLLA)、ポリ乳酸/ポリエチレングリコール共重合体 (multi) の三種類のフィルムを用いた。孔の径による違いを調べるため、フィルムの中心部の 1mm 四方の中に、3種類の直径 (50, 100, 250 μm) をもつ円柱孔を作製した。これらをラット背部に皮下移植した後、経時的に周辺組織とともに摘出し、材料周辺組織の免疫染色により、マクロファージやリンパ球などの血球系細胞の種類や密度を調べるとともに、周辺組織中のサイトカインの発現パターンを PCR により解析した。

【結果と考察】材料表面特性による違いを調べるための、孔のない材料近傍の組織学的観察の結果、移植3日後におけるマクロファージの遊走は、multi よりも PLLA の方が3倍以上も多く、1ヵ月後の材料周辺の被覆化組織は、PLLA の方が3倍程度厚かった。一方、創傷治癒と炎症に着目した4種類のサイトカインの発現パターンを、移植 3週間までの期間で測定した結果、multi と PLLA とで発現パターンに大きな差は認められなかった。したがって、カプセル化の厚みとマクロファージの遊走には相関があると考えられたが、本研究で着目したサイトカインだけでは組織の再生を判別しにくいことがわかった。

【結論】パターン化された有孔材料を用いることで、スキャフォールドに対する生体応答を簡略化でき、組織再生機構の解明が期待できる。

脱細胞化角膜実質を用いた再生型人工角膜 の開発と機能評価

○橋本良秀¹, 船本誠一^{1,2}, 佐々木秀次³, 望月學³, 南広祐^{1,2},
服部晋也⁴, 藤里俊哉⁵, 木村剛^{1,2}, 小林尚俊⁶, 岸田晶夫^{1,2}

¹東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ²JST-CREST, ³東京医科歯科大学医学部附属病院 眼科, ⁴ヒューマンサイエンス振興財団, ⁵大阪工業大学 工学部, ⁶物質・材料研究機構 生体材料センター

1. 緒言

角膜移植は重篤な角膜疾患において最も効果的な治療法であるが、慢性的なドナー不足が問題となっている。我々は、この問題を解決するために、脱細胞化組織の応用について検討しており、これまで、超高压技術による脱細胞化角膜実質の作製について報告した。本研究では、in vivo 試験により脱細胞化角膜実質の炎症反応、再生過程および透明性の変化について検討を行った。また、脱細胞化角膜実質上での角膜上皮再生について検討した。

2. 実験

成体ブタ角膜を超高压処理(10°C, 10000atm, 10min)し、3日間振盪洗浄することにより脱細胞化角膜実質を作製した。得られた組織の脱細胞化に関して組織学的、残存DNA, GAG 定量により評価した。日本白色家兎の角膜に作成したポケットに脱細胞化角膜実質を移植し、透明性、炎症反応/再生過程について経時的に観察を行った。また、レシピエントの角膜上皮を一部欠損させた後、脱細胞化角膜実質を移植し、移植片上での再上皮化について検討した。

3. 結果と考察

超高压処理した角膜では、完全な細胞除去が達成され、コラーゲン繊維の配向も維持されていた。白色家兎への移植において、未処理角膜では炎症性細胞の浸潤および新生血管が観察され、急性拒絶反応が惹起された。一方、脱細胞化角膜実質では、炎症反応はほとんど観察されず、周囲組織に定着していた。脱細胞化角膜実質の再上皮化に関する結果も含め、詳細は当日報告する。本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金および日本学術振興会科学研究費補助金により行われた。

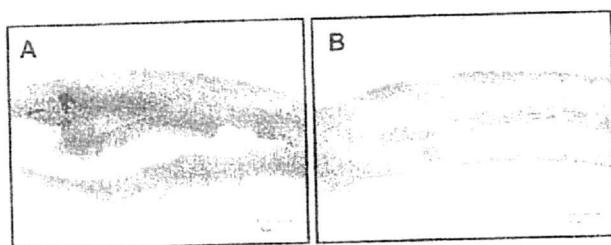


Fig. HE staining of specimens implanted for 8 weeks. (A) native, (B) decellularized.

"Characterization of Artificial Cornea using Decellularized Corneal Stroma"

○Yoshihide Hashimoto¹, Seiichi Funamoto^{1,2}, Syuji Sasaki³, Manabu Mochizuki³, Kwangwoo Nam^{1,2}, Shinya Hattori⁴, Toshiya Fujisato⁵, Tsuyoshi Kimura^{1,2}, Hisatoshi Kobayashi⁶, Akio Kishida^{1,2}
¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, ²JST-CREST, ³Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, ⁴Japan Health Sciences Foundation, ⁵Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology, ⁶Biomaterials Center, National Institute for Materials Science (NIMS)

TEL: +81-3-5803-4017. E-mail: kishida.fm@tmd.ac.jp

YP31 スキャフォールド材料に対する生体応答の遺伝子網羅的解析

○江橋 具^{1,2}, 竹村太郎³, 箕輪貴司³,
花方信孝³, 小林尚俊⁴, 山岡哲二^{1,2}

- 1) 国立循環器病センター研究所 生体工学部, 2) JST-CREST,
3) 独立行政法人 物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合センター
4) 独立行政法人 物質・材料研究機構 生体材料センター

1. 緒言 古くから、バイオマテリアルの生体親和性や生体適合性が調べられている。マテリアルを移植すると、補体の活性化、免疫細胞の遊走やサイトカインの産生など、多くの初期生体応答が惹起され、その後に、組織再生、あるいは慢性炎症反応やカプセル化などによる再生阻害が起こる。これまで、マテリアル表面でのフィブリンや補体の活性化や、マクロファージによるサイトカイン産生が *in vitro* で調べられてきた。しかし、*in vivo* においては、種々のタンパク質や細胞が複雑に相互作用していると考えられるにも関わらず、詳しい検討が行なわれていないのが現状である。われわれは、移植初期のマテリアルに対する生体応答と、組織再生や再生阻害との関係を解明するため、皮下移植実験による評価法を検討してきた。本研究では、遺伝子網羅的解析によるさまざまな材料に対する生体応答の挙動を調べることを目的とした。

2. 実験 バイオアクティブあるいはバイオイナートの両極端の表面特性を有するスキャフォールドとして、ポリエチレン多孔質体を、コラーゲンあるいは PMB30 (poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-co-*n*-butyl methacrylate); 東大 石原研より供与) でコートして用いた。マウス皮下に移植後、1ヶ月までの期間で経時的にスキャフォールドと周辺組織を摘出し、HE 染色と免疫染色により単球、好中球とリンパ球を染色した。また、スキャフォールド周辺や内部の新生血管を観察するために、血管内皮細胞の染色も試みた。さらに、スキャフォールド内部や周辺組織における、組織再生を示す遺伝子挙動を調べるため、リアルタイム PCR やマイクロアレイを利用した解析を行った。

3. 結果と考察 移植7日目に移植物を摘出したところ、スキャフォールド周辺には、実体顕微鏡で観察可能な太い血管が形成されていた。組織学的検討から、表面コートの種類によって、内部に浸潤した細胞の形態や密度が異なることがわかった。スキャフォールド周辺組織における、炎症あるいは創傷治癒に代表されるサイトカイン発現量を調べたところ、PMB30 周辺では、いずれのサイトカインもほとんど発現せず、コラーゲンコートでは炎症や創傷治癒をどちらも促進あるいは抑制するタイプとされるサイトカインの発現が認められた。現在、マイクロアレイを用いた、網羅的な遺伝子の発現パターンや量の解析を進めており、初期生体応答と、組織の再生促進や阻害との相関解明が期待できる。

Gene Expression Analysis of Early Host Response against Scaffold

Tomo EHASHI^{1,2}, Taro TAKEMURA³, Takashi MINOWA³,
Nobutaka HANAGATA³, Hisatoshi KOBAYASHI³, Tetsuji YAMAOKA^{1,2}

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute,
²JST-CREST, ³Nanotechnology Innovation Center and ⁴Biomaterials Center of National Institute for
Materials Science

5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka, 565-8565 e-mail; yamtet@ri.ncvc.go.jp

○田中聖也^{1,2}、柿木佐知朗¹、藤里俊哉²、山岡哲二¹¹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 工学部 生体医工学科

1. 緒言

近年、β-sheet 形成性ペプチドよりなるインジェクタブルハイドロゲルが数多く報告されている¹。しかしその多くは、生体内のアミノ酸配列を模倣したものではないため、これらのハイドロゲルを生体内に移植した場合、高い抗原性を示すことが懸念される。そこで我々は、生体内に多く存在するタンパク質のβ-sheet 部位のアミノ酸配列を模倣することで、抗原性が低いβ-sheet 形成性インジェクタブルハイドロゲルができるであろうと推測した。そこで本研究では、β₂-ミクログロブリンの anti-parallel β-sheet 部位のアミノ酸配列 (I³⁵EID³⁸/R⁶⁰VKH⁸³) を模倣した β-sheet 形成性インジェクタブルハイドロゲルの設計を試みた。

2. 実験

β₂-ミクログロブリン模倣ペプチド Ac-(RVKVEIDI)₂-CONH₂ [Peptide A]、および Ac-(RVEIKVDI)₂-CONH₂ [Peptide B]は、樹脂に Fmoc-PAL-PEG Resin、縮合剤に DMT-MM を用いた Fmoc 固相法で合成した。ペプチド鎖の伸長後、N 末端をアセチル化し、95%TFA 水溶液で脱樹脂とアミノ酸側鎖の脱保護を行った。得られたペプチドの同定には、MALDI-TOF/MS を用いた。

各ペプチドを、種々の有機溶媒および pH の異なる緩衝液に溶解し、その pH 変化等の操作によってゲル化が起こるかを検討した。

3. 結果と考察

MALDI-TOF/MS の測定結果より、Peptide A および Peptide B の合成を確認した。これらペプチドは、DMSO と強塩基性溶液によく溶解した。DMSO に各ペプチドを溶解し、ペプチドの最終濃度が 0.5w/v% となるように超純水を加えることで、透明で非常に粘度の高いゲル様物質を形成させることに成功した。Peptide A においては、強塩基性溶液にペプチドを溶解した後に塩酸を加えつつ中和していくと、DMSO の場合と同様に、ゲル様物質が形成した。ペプチド溶液中でペプチドが静電的相互作用により凝集し、β-sheet 構造を形成することによって流動性を失い、ゲル様物質になったと考えられる。これらの結果より、β₂-ミクログロブリン中の anti-parallel β-sheet 部位を模倣した Peptide A および Peptide B は、インジェクタブルハイドロゲル担体となりうることが示唆された。

参考文献 1) Y. Zhao, H. Yokoi, M. Tanaka, T. Kinoshita, T. Yan, *Biomacromolecules* (2008), 9, 1511-1518.

Gelation behavior of injectable hydrogel consisted of β-sheet peptides under various conditions

Seiya TANAKA^{1,2}, Sachiro KAKINOKI¹, Toshiya FUJISATO² and Tetsuji YAMAOKA¹

¹Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan

²Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

Tel: 06-6833-5012 (ext.2637), Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

脱細胞大動脈に対する石灰化反応の経時的低侵襲評価

○山口晴加^{1,2}、鈴木彩香^{1,2}、佐合 満^{1,2}、朝本康太^{1,3}、
江橋 具¹、森反俊幸²、藤里俊哉³、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) 鈴鹿医療科学大学 3) 大阪工業大学

1. 緒言 重篤な血管の疾患では、人工血管への置換が有効である。しかし成長期にある小児患者においては、石灰化や再狭窄が高確率で発生するため、再置換術が必要となる。したがって、移植直後から細胞が速やかに浸潤して血管壁を再構築すると共に、移植血管の骨格が分解されて、完全に患者の組織と置換される再生型人工血管が望まれている。そこでわれわれは、超高圧印加処理により脱細胞化血管を作製し、ブタを用いた大動脈置換実験を行ってきた。その結果、開存性は良好で、移植後早期より血管壁に細胞が浸潤して、速やかな自己組織化が認められた。しかし、この脱細胞化血管でも、いくつかの例で血管壁の石灰化の問題が残った。本研究では、石灰化を抑制するための処理溶液を検討するとともに、ラット皮下に移植したブタ大動脈血管を、X線CTを用いて追跡することで、非侵襲的かつ経時的な *in vivo* 石灰化反応の評価を試みた。

2. 実験 ブタの大動脈血管壁を8mm角に細切して、生理食塩水と共に袋に入れて密封し、980 MPaの圧力を30°C温度下で10分間印加した。次に、圧力処理により破壊された細胞を除去するため、DNase Iを0、4、40、400 unit/mLの濃度で添加したEBMまたは生理食塩水で3、7、14日間洗浄した。洗浄後、リン脂質除去を目的として80%エタノール中での振盪と、エタノール除去のための生理食塩水への置換を行った。各溶液を用いて作製した脱細胞化血管のHE染色により、脱細胞化の有無や組織の構造変化を比較した。その後、脱細胞化処理に用いた各溶液が組織の石灰化に及ぼす影響を調べるため、ラット背部への皮下移植を行い、移植後1ヶ月目と3ヶ月目にX線CTでの撮像から骨塩量を測定した。さらに、3ヶ月目には組織を摘出し、原子吸光度計を用いて、組織内の含有カルシウム量を定量した。

3. 結果と考察 HE染色の結果、EBMでは、いずれのDNase I濃度においても、良好に細胞が除去されていることが確認された。一方、生理食塩水では、洗浄3日ではすべての条件で脱細胞化されなかったが、7日では400 unit/mL、14日では40と400 unit/mLの条件で脱細胞化された。移植実験で石灰化形成を評価した結果、移植1ヵ月後において、DNase Iが0と4 unit/mLの濃度のEBMで14日間洗浄した組織に石灰化が確認された。EBM中の何らかの成分が石灰化に関与していると考えられる。X線CTによる非侵襲的かつ経時的な脱細胞組織に対する石灰化反応の評価は、簡便かつ有用な手段であることがわかった。

Noninvasive Evaluation of Calcification in Acellular Blood Vessels

Haruka YAMAGUCHI^{1,2}, Ayaka SUZUKI^{1,2}, Mitsuru SAGOH^{1,2}, Kouta ASAMOTO^{1,3}, Tomo EHASHI¹,

Toshiyuki MORITAN², Toshia FUJISATO³, Tetsuji YAMAOKA¹

1) Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute

2) Suzuka University of Medical Science, 3) Osaka Institute of Technology.

5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka, JAPAN. e-mail; yamtet@ri.ncvc.go.jp

血管組織の脱細胞操作における不要タンパク成分の除去

○鈴木彩香^{1,2}、山口晴加^{1,2}、江橋 具¹、森反俊幸²、岸田晶夫³
藤里俊哉⁴、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鈴鹿医療科学大学
³東京医科歯科大学、⁴大阪工業大学

1. 結言 循環器系疾患の外科的治療として人工血管が用いられるが、成長期の小児では、石灰化や再狭窄が成人より顕著なことから、人工血管のサイズが合わなくなり再手術を必要とすることなどが問題となっている。そのため、移植後、完全に患者の組織と置換されると期待される、脱細胞化血管が注目されている。これまで、我々が超高圧処理法を用いて作製した脱細胞血管を、ブタ大動脈に移植した結果、稀に石灰化が観察されている。脱細胞血管に対する石灰化反応は、残存するタンパク成分に基づく可能性も指摘されているため、本報告では、ブタ大動脈の脱細胞化処理において施圧液や洗浄液を変更し、タンパク質の除去効果を検討した。

2. 実験 ブタ大動脈血管壁を細切し、施圧液に浸漬して超高静水圧印加により細胞破壊した。その後洗浄液で14日間洗浄した。表1に処理に用いた施圧液と洗浄液との組み合わせを示す。さらに、80%エタノールと各施圧液中で、3日間ずつ振盪し、リン脂質や洗浄液成分を除去した。洗浄工程7、14、20日目に組織

Table 1. Buffer solutions used.

溶液	施圧液	洗浄液
#1	Alsaver's solution	Alsaver's solution
#2	Ringer's lactated	Ringer's lactated
#3	PBS	EBM
#4	lactate (hypertonic solution)	lactate (hypertonic solution)
#5	lactate (isotonic solution)	lactate (isotonic solution)

のHE染色を、14、20日目に残留タンパク成分をSDS-PAGEで評価した。

3. 結果と考察 脱細胞化処理後の組織をHE染色で評価したところ、洗浄工程14日目で#2、#3、#4の条件で核が除去されていた。しかし#1と#5の条件では、処理終了日の20日目でも核は除去されていなかった。SDS-PAGEの結果、#2の条件で脱細胞した血管は、最もタンパク質の除去効果が高く#1や#3の条件で処理したものは、効果が低かった。また、#4や#5の条件の場合には、いずれも低分子量のタンパク質がよく除去されていた。これらのことより、脱細胞処理における施圧・洗浄液はRinger's lactatedが最も効果があると考えられた。

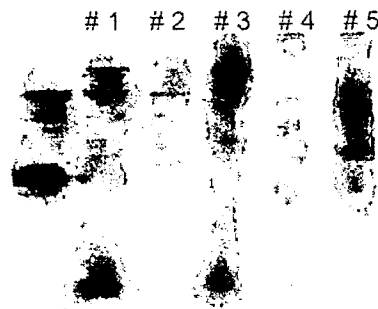


Fig. 1. Protein analysis by SDS-PAGE of treated vessels.

Removal of the unnecessary protein ingredient in decellularized vascular tissue.

A. Suzuki^{1,2}, H. Yamaguchi^{1,2}, T. Ehashi¹, T. Moritan², A. Kishida³, T. Fujisato⁴, T. Yamaoka¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, ²Suzuka University of Medical Science, ³Tokyo Medical and Dental University, ⁴Osaka Institute of Technology

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

ヘパリン含有 PVA 人工血管の創製

(東医歯大 生材研¹・大工大²) ○根岸淳¹・木村剛¹・
南広祐¹・藤里俊哉²・岸田晶夫¹

1. 緒言

冠動脈バイパス術は日本で年間 2 万件以上実施されている。使用されるグラフトは、他家血管や人工血管では供給不足や血栓形成などの問題があり、自己血管が大部分を占めている。しかし、患者への侵襲が大きいため、抗血栓性を有し力学的強度に優れた小口径人工血管の開発が望まれている。当研究室では、超高压印加 (Ultra High Pressure :UHP) を利用してヘパリン含有ポリビニルアルコール (PVA) 物理架橋ゲルの開発を行っている。PVA ゲルは化学架橋、凍結融解法など様々な方法で得られるが、化学架橋には残存する架橋剤の生体への影響が懸念される。本研究では、UHP 法により作製したヘパリン含有 PVA ゲルを中空構造に成型し、小口径人工血管としての応用可能性を検討した。

2. 実験

DACRON メッシュを内面に配置したガラス管にヘパリン-PVA 溶液を流し込み、さらにスチロール樹脂ロッドを中心に固定し、UHP 処理 (10,000atm、加圧 5 分、保持 10 分、減圧 5 分) を行い、外面にダクロンを有する中空状のヘパリン含有 PVA ゲルを得た。さらに、ゲルの外側に PVA 溶液を加え、再度超高压印加し内腔から、ヘパリン含有 PVA/DACRON/PVA の人工血管を作製した。得られた人工血管 (内径: 1mm、壁厚: 0.5mm) の力学的強度、ヘパリン徐放・ATIII 活性を評価した。また、作製した人工血管をラット頸動脈に移植し、生体反応を検討した。

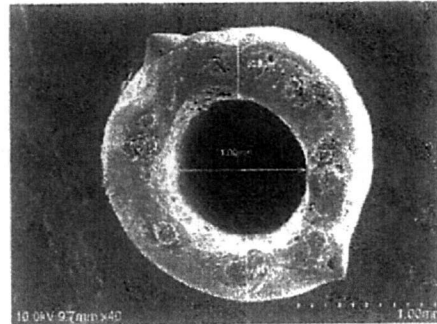


Fig. SEM image of PVA vessel

3. 結果と考察

作製した人工血管からのヘパリン徐放は 504 時間後も継続していることが確認された。作製工程の各処理によるヘパリンの ATIII 活性には変化がなく、人工血管から溶出したヘパリンは抗血栓性を有していると考えられる。また、破裂試験では 750mmHg の耐圧を示し、ダクロンを加えることにより、力学的強度が向上した。ヘパリン含有 PVA 人工血管は生体使用に耐えうる力学的強を有し、ラット移植時も破裂することなく生体使用が可能であった。現在、ラット頸動脈移植実験を行い生体反応の検討を行っている。

Preparation of PVA-Heparin vascular graft by Ultra High Pressure Method

Jun Negishi¹, Tsuyoshi Kimura¹, Kwangwoo Nam¹, Toshiya Fujisato², Akio Kishida¹

¹Tokyo Medical and Dental University, Institute of Biomaterials and Bioengineering, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ²Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585 Japan.

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

口演10 血管 2

座長：小山博之（東京大学医学部附属病院 ティッシュ・エンジニアリング部 血管再生医療）

- 1 新しい脱細胞化技術を用いた小口径血管スキャフォールドの開発
梶原俊介（神戸大学大学院 医学研究科 形成外科学，神戸大学大学院 医学研究科 美容医科学）
- 2 小口径脱細胞化血管の作製とin vitro/vivo評価
根岸 淳（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所）
- 3 脱細胞血管に対する石灰化評価とその抑制法
山岡哲二（国立循環器病センター研究所 生体工学部）
- 4 再生医療への応用を目指した脱細胞血管スキャフォールドデバイス
守本祐司（防衛医科大学校 分子生体制御学講座）
- 5 生分解性ハイドロゲル挿入による積層化細胞シートへの血管様管腔構造の作製
杉林 康（東京女子医科大学 先端生命医科学研究 所 TWIns）
- 6 血管付3次元組織構築の検討
野口慎介（早稲田大学 先進理工学研究所 梅津研究室，東京女子医科大学 先端生命医科学研究 所）
- 7 立体的な組織の再生を目指した血管誘導ゲルの開発
服部理恵子（東京大学 医学系研究科 外科専攻 口腔外科，東京大学医学部附属病院 ティッシュエンジニアリング部 血管再生医療講座）

O-10-2 小口径脱細胞化血管の作製とin vitro/vivo評価

根岸 淳¹，松本誠一¹，木村 剛¹，樋上哲哉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札幌医科大学 第二外科

【目的】小口径人工血管は中・大口径に比べ早期血栓を生じやすく、血栓予防可能な材料が望まれている。血栓予防として、抗血栓性薬剤や抗血栓性高分子の利用、人工血管の内皮化が検討されている。当研究室では、超高压法により調製した脱細胞化大動脈において良好な移植成績と早期内皮化を報告した。内皮化には、基底膜などの生体血管構造が重要と考え、本研究では、小口径脱細胞化血管の調製における超高压・洗浄条件と生体血管構造・物性相関および早期内皮化等の検討を行った。【方法】種々のブタ動脈（頸動脈・胃大腸動脈・腸骨動脈）について、脂肪組織をトリミング後、血管分枝を結紮した。30℃・10分間・10000気圧で超高压処理を行い、種々の条件にて細胞残渣を洗浄し、小口径脱細胞化血管を調製した。脱細胞化評価として、組織学的評価、力学試験による物性評価を行った。in vitro及びin vivo評価として、細胞接着試験・ラット頸動脈移植実験を行い、小口径脱細胞化血管の応用を検討した。【結果と考察】本法により各動脈の細胞除去が可能であった。また、従来の界面活性剤法より高い細胞除去効率を示した。脱細胞化組織の構造維持は洗浄条件が強く影響することが明らかとなった。小口径脱細胞化血管のラット移植実験より、超高压法脱細胞化による免疫反応抑制、閉塞率向上が示された。以上より、本法によって調製した脱細胞化動脈の小口径人工血管としての応用可能性が示唆された。

O-10-3 脱細胞血管に対する石灰化評価とその抑制法

山岡哲二¹，湊谷謙司²，田中裕史¹，山口晴加³，
黒川理世⁴，森反俊幸³，中谷武嗣¹，藤原俊哉⁴

¹国立循環器病センター研究所 生体工学部，²岩手医科大学，³鈴鹿医療科学大学，⁴大阪工業大学

【緒言】我々はこれまでに、ブタ心臓弁・血管に脱細胞処理を施した再生型人工血管の検討を重ねてきた。その結果閉存性は良好で、移植後早期より血管壁に細胞が浸潤して、速やかな自己組織化が認められた。しかしながら、様々な改良にもかかわらず、石灰化を完全に阻止するまでには至っていない。本研究では、脱細胞化血管を作成する際の洗浄液を検討することにより、石灰化の抑制を試みた。【実験】ブタの大動脈血管壁を5mm角に細切し、施圧液と共に袋に入れ、980MPaの圧力を印加し、様々な洗浄液による洗浄を2週間行った。各洗浄液には、所定濃度のDNaseを添加した。洗浄後、リン脂質除去のため、エタノールでの振盪（脂質除去）を行い、生理食塩水に保存した。これらの組織をラット背部皮下に埋入試験的的にX線CTでの撮像から骨塩量を測定し、3ヶ月目には組織を摘出し、組織内の含有カルシウム量を定量化した。また、同様にして作成した脱細胞血管をブタ胸部下行大動脈に置換し、3・6・12ヶ月後にその石灰化について検討した。【結果】ラット皮下埋入後に経時的にμX線CTにて評価するシステムは、早期の石灰化を容易に評価できる優れたシステムであった。また、胸部下行大動脈置換実験の結果からも、二価カチオンを含まない洗浄液の使用が石灰化を効果的に抑制することが明らかとなった。

口演38 視覚・聴覚

座長：坪田一男（慶應義塾大学 医学部 眼科学教室）

- 1 脱細胞化角膜実質移植による角膜再生の試み
橋本良秀（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所）

- 2 角膜実質代価物の作製を目指した光透過性架橋コーラゲンの線維構造と機能の制御
田中佑治（東北大院医）

- 3 ヒト虹彩由来細胞から網膜神経細胞への分化誘導
山本直樹（藤田保健衛生大学 共同利用研究施設 分子生物学・組織化学研究室）

- 4 脂肪組織由来間葉系細胞のパラクライン効果による感音難聴治療
吉田充裕（京都大学大学院 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学）

- 5 Notchシグナル操作による生後哺乳類蝸牛での有毛細胞誘導
山本典生（京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

- 6 インスリン様細胞成長因子1 (IGF-1) による蝸牛有毛細胞生存促進効果
林 裕史（京都大学大学院 医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

- 7 内耳細胞治療における移植細胞ソースとしてのiPS細胞の能力と問題点
中川隆之（京都大学大学院 医学研究科 耳鼻咽喉科頭頸部外科）

O-38-1 脱細胞化角膜実質移植による角膜再生の試み

橋本良秀¹、佐々木秀次²、船本誠一¹、望月 學³、
本田貴子^{3,4}、服部晋也^{3,4}、藤里俊哉⁵、木村 剛^{1,6}、
小林尚俊³、岸田晶夫^{1,6}

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 医学部付属病院 眼科、³独立行政法人 物質・材料研究機構 生体材料センター、⁴ヒューマンサイエンス振興財団、⁵大阪工業大学 工学部 ⁶JST-CREST

【緒言】我々は、慢性的なドナー角膜不足を解決するため、超高压技術により作製した脱細胞化ブタ角膜実質の応用を検討している。これまで超高压法によるブタ角膜実質の脱細胞化並びに日本白色家兎角膜へのポケット移植での、急性免疫拒絶の抑制を報告した。本研究では、ウサギ上皮欠損モデルにおける、脱細胞化角膜実質上でのレシビエント角膜上皮の再生および脱細胞化角膜実質の深層角膜移植による角膜再生について検討した。【実験方法】成体ブタ角膜に超高压処理(10℃, 10000atm, 10min)を施し、細胞を破壊した後、3日間振盪洗浄することにより脱細胞化角膜実質を作製した。レシビエントの角膜上皮を直径2あるいは4mm欠損をさせた後、脱細胞化角膜実質を移植した。移植片上での再上皮化をフルオレセイン染色により経時的に観察し、組織学的評価を行った。また、脱細胞化角膜実質を深層角膜移植し、経過観察を行った後、組織学的に評価した。【結果と考察】脱細胞化角膜実質上における角膜上皮再生において、血管新生および上皮細胞のdown-growthは観察されず、移植後2週間で角膜上皮が再生することが明らかとなった。また、移植片への角膜実質細胞の浸潤が観察された。脱細胞化角膜実質の深層角膜移植に関する結果も含め、詳細は当日報告する。本研究の一部は厚生労働省科学研究費補助金および日本学術振興会科学研究費補助金により行われた。

P-195 脱細胞血管のin vitroでの内皮化

黒川理世¹, 寺田堂彦¹, 山岡哲二², 藤里俊哉¹

¹大阪工業大学 工学部 生体医工学科, ²国立循環器病センター

[目的]

我々はこれまでにミニブタ脱細胞化動脈を作成し、同種同所性の移植実験を行ってきた。1年後の成績では極めて良好な結果を認める例がある一方、石灰化や狭窄を認める例もあり、安定して良好な成績を得ることが課題となっている。これまでは脱細胞化血管のみを移植するin vivo再生を志向してきたが、本研究では予めレシビエントの内皮細胞を播種しておくin vitro再生の効果を検討すべく、脱細胞血管の内皮化を行った。

[方法]

凍結乾燥後、120℃24時間の真空熱架橋によって固定化処理を施したブタ大動脈を、エラストーゼのトリスバッファー溶液中に72時間浸漬することで、血管組織からエラスチンを分解除去した。続けてエタノ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。得られた脱細胞化動脈に市販のブタ大動脈内皮細胞を循環培養環境下で播種し、組織学的に観察した。

[結果]

本方法により脱細胞化した大動脈は、コラーゲン線維のみが残存した構造体である。管腔構造を保持するよう工夫し、内皮細胞分散液を循環播種したところ、HE染色にて脱細胞血管の内腔に細胞が接着している様子が観察された。

[考察]

今後、引き続き脱細胞血管の内皮化をより均一なものにし、移植実験に供することで、in vitro再生の効果を検討していく予定である。

セッション 1-1 一般演題 1

γ線をを用いた生体由来組織の脱細胞化処理と移植評価

船本誠一^{1) 2) 3)}、西岡 宏³⁾、吉田謙一³⁾、菊池正博⁴⁾、小林泰彦⁴⁾、藤里俊哉^{3) 5)}、山岡哲二⁶⁾、岸田晶夫^{1) 6)}

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、2) JST SEED V、3) 国立循環器病センター研究所 再生医療部、4) 独立行政法人 日本原子力研究開発機構、5) 大阪工業大学工学部、6) 国立循環器病センター研究所 生体工学部

【目的】我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心膜、気管、軟骨等組織から細胞及びウイルス等のドナー由来成分を除去した脱細胞化組織の開発を行ってきた。脱細胞化組織は、臨床で不足している移植用組織や、再生医療において幹細胞等の患者由来細胞を組み込むための生体スキャフォールドとしての利用が考えられる。これまで、超高压印加処理による脱細胞化方法について報告を行ってきた。超高压処理技術は食品加工技術であるが、一方で食品保存に使用されている γ線照射は、線量により組織破壊を伴わない滅菌やウイルスの破壊も行うことができる。このことを利用した生体由来組織の脱細胞化処理を検討した。

【方法】脱細胞化処理方法は、食用ブタあるいはミニブタ大動脈を PBS に浸漬し、10 Gy から 1000 Gy の範囲で γ線を照射した。続けて、洗浄液にて 2 週間洗浄した。照射直後と洗浄後の処理組織を HE 染色で観察するとともに、組織内残存 DNA 量の測定を行った。また、照射線量による組織の力学特性への影響を、力学試験機を用いて調べた。さらに、処理後の脱細胞化組織をラット皮下に移植し、2 週間後に取り出し組織学的に評価した。

【結果および考察】HE 染色の結果、γ線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存が見られたが、組織の γ線照射線量が増えるにつれて組織内の核の数が減少していた。組織内残存 DNA 量も、100 Gy 以上では大幅に減少する傾向が見られた。また、γ線を用いた脱細胞化組織の力学特性に変化は見られなかった。さらに、移植後 2 週間の組織の CD68 染色の結果、未処理組織では組織内部に CD68 陽性細胞が多く見られたのに対し、脱細胞化組織においては CD68 陽性細胞が減少しており、特に 300Gy と 1000Gy のものでは組織内部の炎症が大幅に抑制されていた。これらのことから、γ線を用いた脱細胞化処理方法は生体スキャフォールド作製に有効であると示唆された。