

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 1.0×10^6 cells/mL. They were then injected into the acellular scaffold with the non-needle injector for percutaneous insulin administration (SHLMAJet[®]; 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 μ 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

(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.

(337) Preparation and Characterization of Cornea Decellularized by Ultra High Pressurization

Kimura T., Funamoto S., Hashimoto H., Sasaki S., Mochizuki M., Fujisato T., Kobayashi H., Kishida A.

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan

Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Asahi-u, Osaka, Japan
Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Although corneal transplantation is an effective treatment for serious corneal diseases, the lack of supply is one of important problems. Also, inflammatory rejection has often occurred. In the present study, we developed the decellularized cornea by ultra high pressurization as novel artificial cornea. Porcine corneas were pressurized at 4,000 to 10,000 atm and 10 to 30 degrees C for 10 min, and then immersed in culture medium containing DNase I, antibiotics for 72 hours to remove the cellular components (UHP method). The decellularized corneas were subjected to histological study (H-E staining). The transparency, thickness and mechanical strength of them were investigated. When a porcine cornea was hydrostatically pressed at 4,000 or 10,000 atm at 10°C for 10 min, semi-transparent cornea was obtained by pressurization at 4,000 atm and 10°C. The transparency of cornea was decreased under the higher pressure and temperature condition. The swelling of them was observed for the washing process. By H-E staining, the complete removal of epithelial and stromal cells was confirmed in all of the pressurized corneas. The superstructure of their collagen fibrils was relatively maintained. Furthermore, the transmittance of the decellularized corneas by UHP method was recovered by the immersion of them in glycerol and the mechanical property similar to native cornea was shown. These results indicate that the decellularized cornea by UHP method would be useful as corneal scaffold for regeneration.

Acknowledgements: We are grateful for funding from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

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(関ジャパンファーム)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き、重量と比重を測定して断面積を算出した。

引張試験

各弁尖の内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

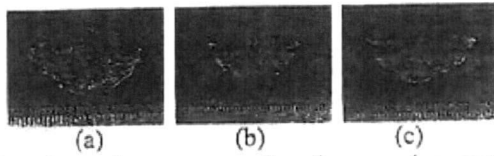


Fig. 1 Appearance of native porcine aortic valve. (a), right coronary cusp (RCC); (b), non coronary cusp (NCC); (c), left coronary cusp (LCC).

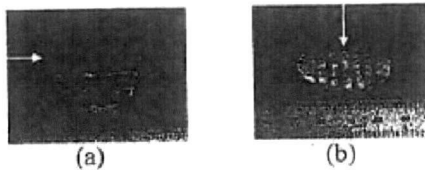


Fig. 2 Valvular strips for tensile test in each direction. (a), circumference; (b), radial direction. Arrow in the figure points a tensile specimen.

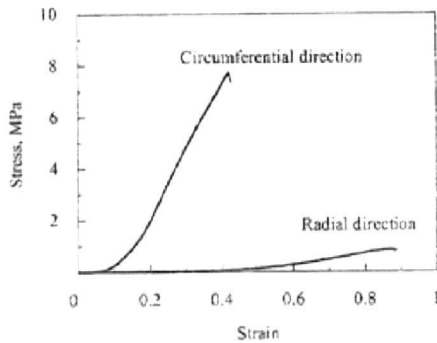


Fig. 3 Stress-strain curves of valvular strip in circumferential and radial direction.

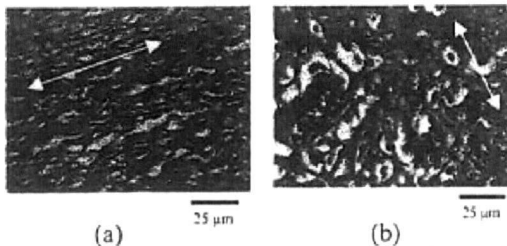


Fig. 4 Elastic van Gieson staining of a cross-section on (a) circumferential and (b) radial directions of a native porcine valvular leaflet. Arrow in the figure shows each direction.

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

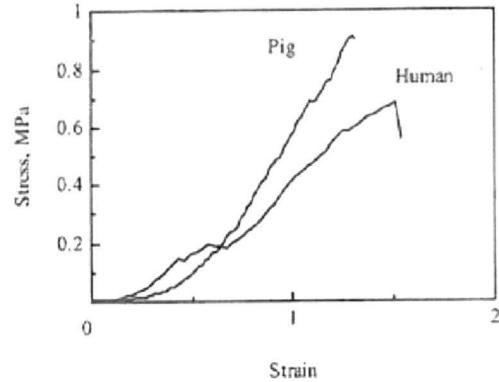


Fig. 5 Stress-strain curve of a human and a porcine valve leaflet. Tensile direction is parallel to circumferential direction of a valve leaflet.

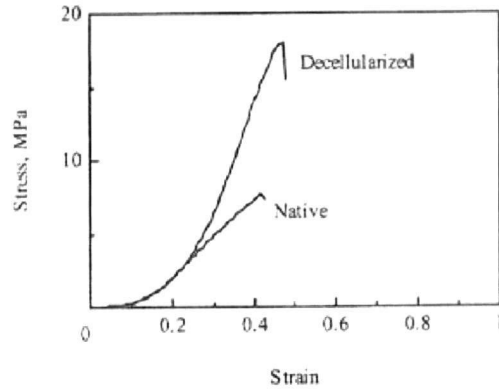


Fig. 6 Stress-strain curves of a decellularized and a native porcine valve leaflet. Tensile direction is parallel to radial direction of a valve leaflet.

における応力歪み曲線を示した。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う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。

筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化

大西 優貴, 川北 悠介, 山崎 健一, 藤里 俊哉, 宇戸 禎仁
大阪工業大学大学院 工学研究科 (大阪市旭区大宮 5-16-1)
suto@ee.oit.ac.jp

現在, 注目を集めている培養筋肉の医工学応用において, 筋芽細胞の分化を制御することや多核筋管細胞の収縮動態を調べるのが重要である。筋肉を構成する筋細胞は, 筋芽細胞が分化し成熟したものであり, 筋芽細胞の分化を制御するうえで分化の判定技術が大切である。現在実用的な判定方法として染色技術や DNA を調べる方法が挙げられる。しかしこれらの方法は, 時間やコストの面から考えると今後改善する余地がある。そこで本研究では, 時間とコストの改善と分化後の多核筋管細胞の収縮動態を調べる方法として細胞膜電位計測技術の応用を提案した。

1. はじめに

現在, 次世代アクチュエータや医学における培養筋, 工学に於ける人工筋のような培養筋肉の医工学応用が注目を集めている。本研究は, 培養筋肉の状態を電氣的に評価する方法を目的としている。^[1] 培養筋肉を構成する筋細胞は, 筋芽細胞が分化, 成熟したものであり筋細胞の医工学応用の研究においては, 細胞の分化を制御することが重要となる。分化を制御するうえで分化の判定技術が大切である。しかし実用的である染色やDNAを調べる方法は, コストや時間の面で今後改善する余地がある。そこで本研究では, 分化を判定することと分化後の細胞を電氣的に評価することを考慮にいれ細胞膜電位計測技術を応用した新しい判定技術を開発する。細胞膜電位とは, 細胞膜の内側空間と外側空間の電位差であり, 細胞膜上に多数分布しているタンパク質であるイオンチャネルによって発生する。^[2]

2. 実験方法

培養筋芽細胞は, マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いた。10%FBS 含有 DMEM で増殖培養し, 分化誘導は, 60mm ディッシュにサブコンフルトとなった細胞を 2%HS 含有 DMEM で行った。

外径 1[mm]の中空ガラス管を熱で加工し, 先端径が 1[μ m]以下の針状に作製した。このガラス管内に高濃度電解質の 3[M]KCl 水溶液を満たして Pt 線を浸し電極とした。計測には, 電極抵抗値が 10[M Ω]前後のものを用いた。倒立顕微鏡下でガラス電極を細胞内に刺入したときの細胞の内側空間と外側空間の電位差を計測し, 高入力インピーダンス増幅器へ導いた。そしてこのときの電位差をオシロスコープにて波形を観測した。

3. 結果

C2C12 細胞の細胞膜電位を計測した。計測結果の平均値と標準偏差を図 1 にまとめた。

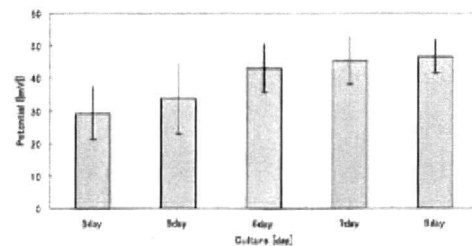


図 1 細胞膜電位の平均値と標準偏差

図 1 より分化と共に細胞膜電位が大きくなっていることが確認できた。詳細は, 当日報告する。

参考文献

- [1]大西・川北・宇戸:平 18 電気学会関西支部, G63.
- [2]曾我部正博:「イオンチャンネル」, pp.2-14, 共立出版, 1997

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, 江橋真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。

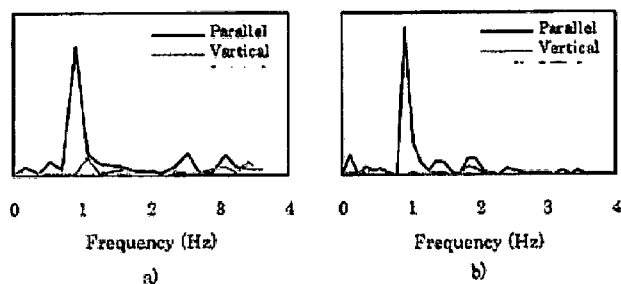


Fig. 1 Spectrum of C2C12 contraction by electric pulse. a) Dish, b) Gel

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するためと考えられる。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

筋管細胞として、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。

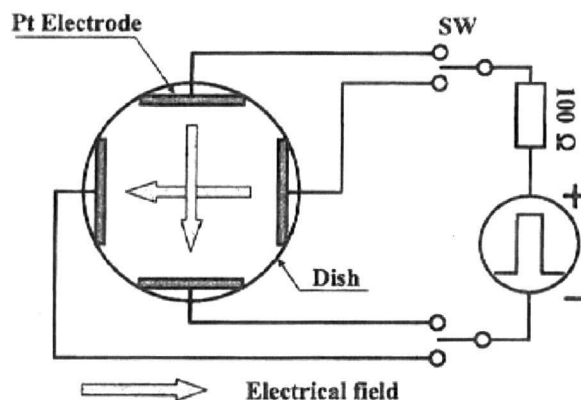


Fig.1 Schematic drawing of experimental system.

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30 Vp-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。

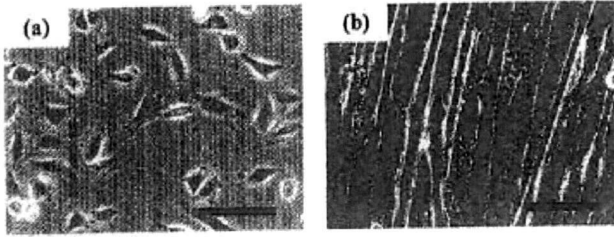


Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells at 2 hours (a) and at 10 days (b). Bar=100 μ m

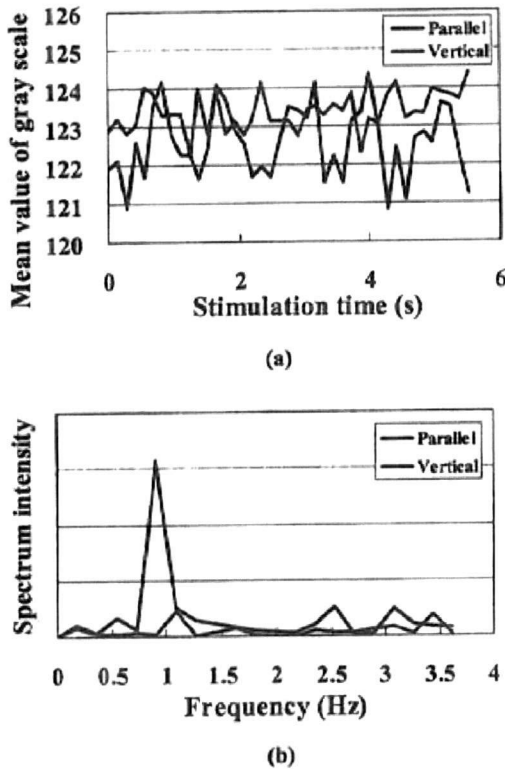


Fig.3 Results of image analysis of C2C12 contraction with electrical pulse at 10 days. (a) Mean value of gray scale, (b) Frequency spectrum.

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はなく、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。

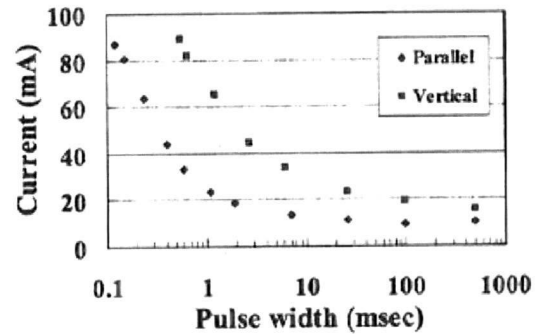


Fig.4 Strength-Duration curve.

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.

A115 電気インピーダンス法を用いた骨格筋の評価

Evaluation of skeletal muscle with electric impedance method

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

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

Takayuki KITA, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

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

Dohiko TERADA, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

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

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

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

1. 緒言

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

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

2. 実験方法

2-1. 酵素モデル

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

2-1-1. 試験片

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

2-1-2. 酵素処理

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

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

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

2-2. 電気インピーダンス測定

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

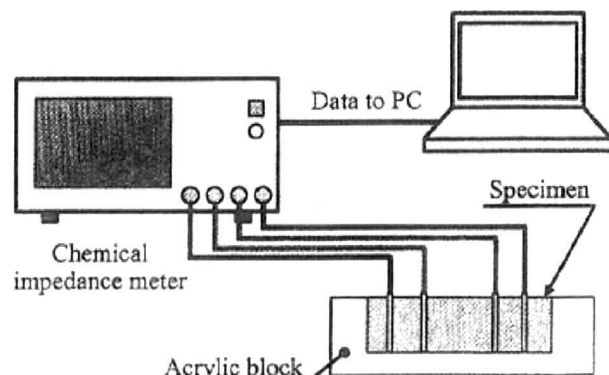


Fig.1 Diagram of measurement system for electric impedance.

2-3. 引張試験

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

2-4. 含水率測定

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

3. 結果

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

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

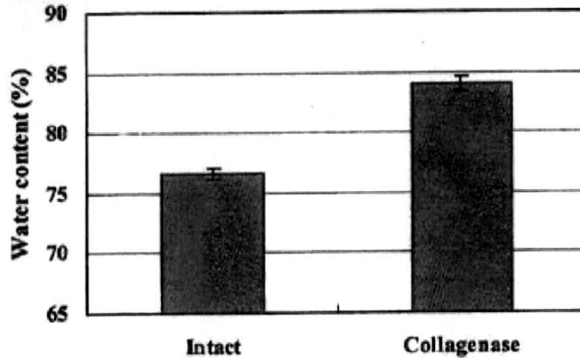


Fig.2 Results from water content measurement (Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

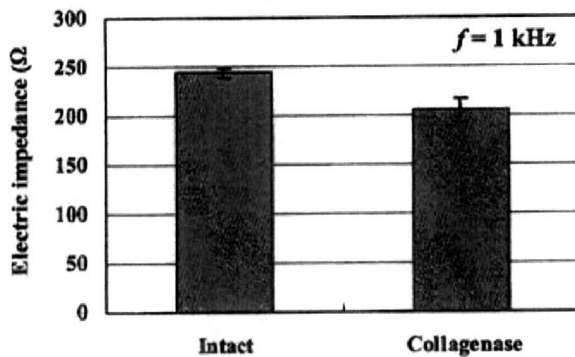


Fig.3 Results from electric impedance measurement (Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

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

4. 考察

骨格筋は筋細胞である筋線維が集まり、筋周膜や筋上膜など深筋膜由来の結合組織が筋線維を束ねることによって構成されている。Intact群に比べてCollagenase群の含水率が高い値を示したのは、酵素処理により結合組織が分解された結果、筋組織が膨潤したためだと考えられる。一般的に、生体組織においては組織内の水分量が高くなるにつれて電気インピーダンスが低くなると報告されている⁽³⁾。Intact群に比べてCollagenase群の電気インピーダンスが低かったことより、骨格筋の電気インピーダンスは基質構造の変化に伴う水分状態の変化を捉えていることが示唆された。よって、電気インピーダンスの測定によって骨格筋の水分状態を調べることで、骨格筋の構造の変化を定量的に

評価することが可能であると考えられる。

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

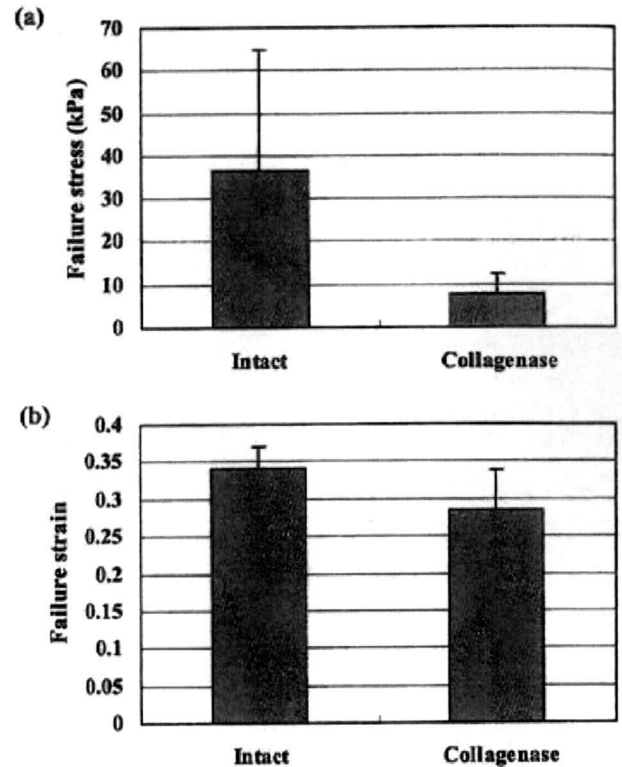


Fig.4 Results from tensile test ((a) failure stress, (b) failure strain, Data represents average value \pm standard division, $n = 3$).

5. 結言

酵素処理を施した骨格筋の電気インピーダンスを測定し、以下の結言を得た。

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

謝辞

本研究は文部科学省学術フロンティア「培養筋の医工学応用」による援助のもとでおこなわれた。

参考文献

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

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

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

Toshia Fujisato²⁾, Dohiko Terada¹⁾, Kazuo Niwaya²⁾, Kenji Minatoya²⁾, Akio Kishida³⁾, Takechi Nakatani³⁾, Sochiro Kitamura³⁾

OBJECTIVES

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

METHODS

Porcine tissues of the heart valves and aortae were isolated under the sterile condition. They were treated immediately by cold isostatic pressing (CIP) of 960 MPa followed by washing at 4°C for decellularization. This does not include any processes using detergents. The acellular scaffolds were transplanted to orthotopic positions of miniature pigs. Postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not 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

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

K. Yamasaki¹, H. Hayashi¹, S. Uto², T. Ehsah², S. Hashimoto¹, H. Tsuruta², S. Mochizuki³, H. Kondo³, M. Yoshiura³, 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.

Results: The C2C12 myotubes contracted on collagen coated substrate at voltage up to 20 V at pulse duration up to 3 msec, and at frequency between 0.05 Hz to 4 Hz. The number of contracting tubes increased as frequency decreased. The motion of C2C12 myotube contraction depended especially on the pulse duration and frequency.

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

P1-058 ACELLULAR PORCINE CORNEA VIA ULTRA-HIGH PRESSURIZATION AS A SCAFFOLD FOR REGENERATION OF CORNEA

¹⁾Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 151-8542, Japan, ²⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 1138510, Japan, ³⁾Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, 565-8555, Japan, ⁴⁾Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center, Osaka, 665-8565, Japan, ⁵⁾National Cardiovascular Center, Osaka, 565-8565, Japan, ⁶⁾Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Ibaraki, 305-0844, Japan

T. Kimura¹⁾, S. Funamoto¹⁾, Y. Hashimoto¹⁾, S. Saseh¹⁾, M. Mochizuki²⁾, K. W. Nam¹⁾, T. Fujisato³⁾, T. Nakatani⁴⁾, S. Kitamura⁵⁾, H. Kobayashi¹⁾, ⁶⁾A. Kishida¹⁾

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

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

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

Regenerative Medicine / Tissue Engineering and Artificial
Organs 2

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

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

Ehashi T¹, Sonekawa S¹, Udagawa H², Fujisato T^{1,2,3}

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 (SHINAJet[®], 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 10 μ l 播種した。1時間静置後に 10%FBS、抗生物質を含む High-glucose DMEM を加えて 5日間培養した。5日後に 10%FBS を 7%HS へと変更してスキヤフォールドに接着した C2C12細胞の融合を促進させた。培養9日目に培養液中に電気パルスを加し、培養筋の動態変化を位相差顕微鏡で観察するとともに、HE染色を行って断面の様子を観察した。【結果】入力電圧 10 Vp-p、周波数 1 Hz、パルス幅 20 msec のパルス電圧に同期して培養筋が収縮弛緩した。周波数を 10 Hz にすると強縮が生じた。HE染色の結果、細胞はスキヤフォールドの表面に多く接着しており、ほとんど内部には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。

組織工学的的手法による人工角膜の開発

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

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

1. 緒言

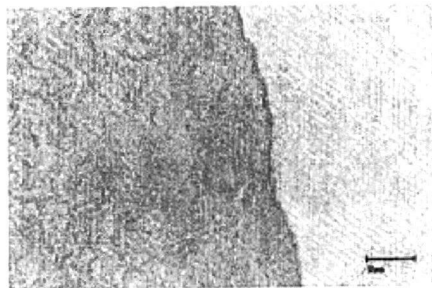
人工角膜として、これまでに多くの材料研究が行われているが、移植後の感染や脱落により、長期間有用である人工角膜の開発には至っていない。一方、異種組織から細胞を除去し、残存する基材を移植組織として用いるために、組織の脱細胞化が検討されている。これまで我々は、脱細胞化法として、超高压印加により組織内の細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣を除去する超高压脱細胞化法を考案した。本手法で、細胞の除去による免疫反応の抑制と生体の微小構造の保持による適合性の向上が期待できる。本研究では、超高压脱細胞化法による人工角膜の作製とその物性解析を行ない、角膜移植片としての可能性を検討した。また、他の脱細胞法である界面活性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

2. 実験

成体ブタの眼球を購入し、角膜を採取した。界面活性剤は Triton-X 100 と SDS を用いた。それぞれの 1% の溶液に角膜組織を浸漬し、37°C にて 24 時間脱細胞化処理を行った。脱細胞化処理後に H&E 染色を行い、脱細胞化を評価した。一方、超高压脱細胞化法には、冷間等方加圧印加装置（神戸製鋼社製）を用い、10°C にて 4,000~10,000 気圧の超高压印加を 10 分間行った。続いて 3 日間の洗浄を行い、細胞残渣を除去することで脱細胞化組織を得た。得られた組織を組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。また、透過率、力学特性の測定およびウサギを用いた *in vivo* 試験により基礎評価を行った。

3. 結果と考察

超高压処理および界面活性剤による脱細胞化を H&E 染色で評価した。H&E 染色標本において、界面活性剤を用いた脱細胞化では、多数の細胞核の染色が確認され完全な脱細胞化はされていなかった。また、コラーゲン線維の断裂と配向の乱れが観察された。このことより角膜の脱細胞化には界面活性剤は適していないと言える。これに対して UHP 処理における組織では、内部の完全な細胞除去が達成され、またコラーゲン線維の配向も維持されていた。しかし、圧力の上昇に伴う透明性の低下と力学特性に変化が見られた。また、洗浄中での浸透圧変化による組織の膨潤が認められた。そこで、脱細胞角膜を高張液であるグリセロールにて浸漬した結果、組織の透明性は回復した。*in vivo* 実験においては、移植直後の脱細胞化移植片は白濁しているが、4 週間経過後で移植組織片は透明になり、8 週間後も透明性を保っていた。これらのことより、人工角膜としての可能性が示唆された。



本研究は、厚生労働省科学研究費の助成を受けて行われた。

Fig. H&E staining of decellularized cornea by ultra-high hydrostatic pressure

Development of artificial cornea by tissue engineering

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

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

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

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

生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討

○ 近藤英雄¹, 北孝之², 寺田堂彦², 山崎健一¹,
橋本成広¹, 藤里俊哉¹

¹大阪工業大学大学院 工学研究科, ²大阪工業大学 工学部

1. 緒言

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

2. 実験方法

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

3. 結果および考察

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

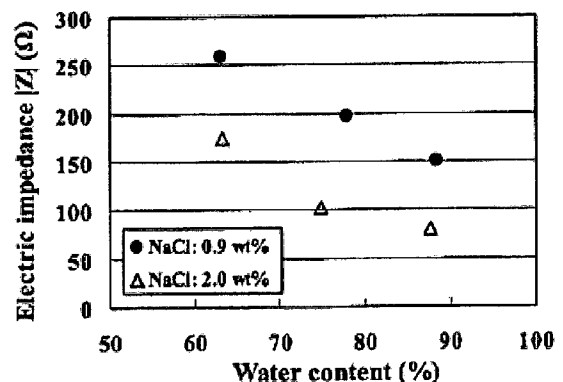


Fig.1 Relation between electric impedance and water content.

Fundamental study on electric impedance method using biopolymer gel

Hideo Kondo¹, Takayuki Kita², Dohiko Terada², Kenichi Yamasaki¹,
Shigehiro Hashimoto¹, Toshiya Fujisato¹

¹Graduate School of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology

²Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

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

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

高親水性高分子を用いた人工血管用スキャホールドの作製と評価

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

1. 緒言

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

2. 実験

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

3. 結果と考察

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

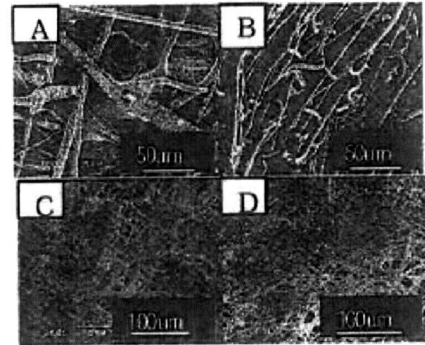


図 1. エレクトロスピンニング条件が繊維径に与える影響。巻き取り速度・距離 = (A) 50rpm・8cm, (B) 109rpm・8cm, (C) 50rpm・6cm, および (D) 50rpm・12cm。

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

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

¹Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita,

Osaka 565-8565, Japan, TEL:+81-6-6833-5012(ext 2637) FAX:+81-6-6835-5476 E-mail :yamtet@ri.ncvc.go.jp

²Department of Organ Transplantation, National Cardiovascular Center.