

自家培養真皮作製の問題点

1. 培養過程に動物由来成分を用いることはできない
未知の感染症の伝播の可能性
異種タンパクに対する免疫、炎症反応の可能性
2. 患者自身から、大量の自己血採取は難しい。

培養過程の血清(ウシ胎児血清FBS)

(医薬発第1314号)

血清は、細胞活性化又は増殖等の加工に必須でなければ使用しないこと。
血清使用が避けられない場合には、以下の点を考慮し、血清からの細菌、
真菌、ウイルス、プリオン等の混入・伝播を防止すること。

- (一) 由来を明確にする。
- (二) 牛海綿状脳症発生地域からの血清を避ける等感染症リスクの低減に努める。
- (三) 由来動物種に特異的なウイルスやマイコプラズマに関する適切な否定試験を行い、ウイルス等に汚染されていないことを確認した上で使用する。
- (四) 細胞の活性化、増殖に影響を与えない範囲で細菌、真菌、ウイルス等に対する適切な不活化処理及び除去処理を行う。例えば、潜在的なウイルス混入の危険性を避けるために、必要に応じて加熱処理、フィルター処理、放射線処理、UV処理等を組み合わせて行う。
- (五) 培養細胞でのウイルス感染のモニター、患者レベルでのウイルス性疾患の発症に対するモニター、異種血清成分に対する抗体産生等の調査のために、使用した血清の一部を保管すること。

FBSの使用は禁止されてはいないが、利益がリスクよりも明らかに大きい時でなければ、使用は難しい。



患者自己血清の使用

自己血清を用いる場合の問題点---採取できる血清量に限界
(10%血清添加の場合、500mlの培地に対し150ml程度の自己血が必要)



無血清培養もしくは血清添加量の減量が必要となる

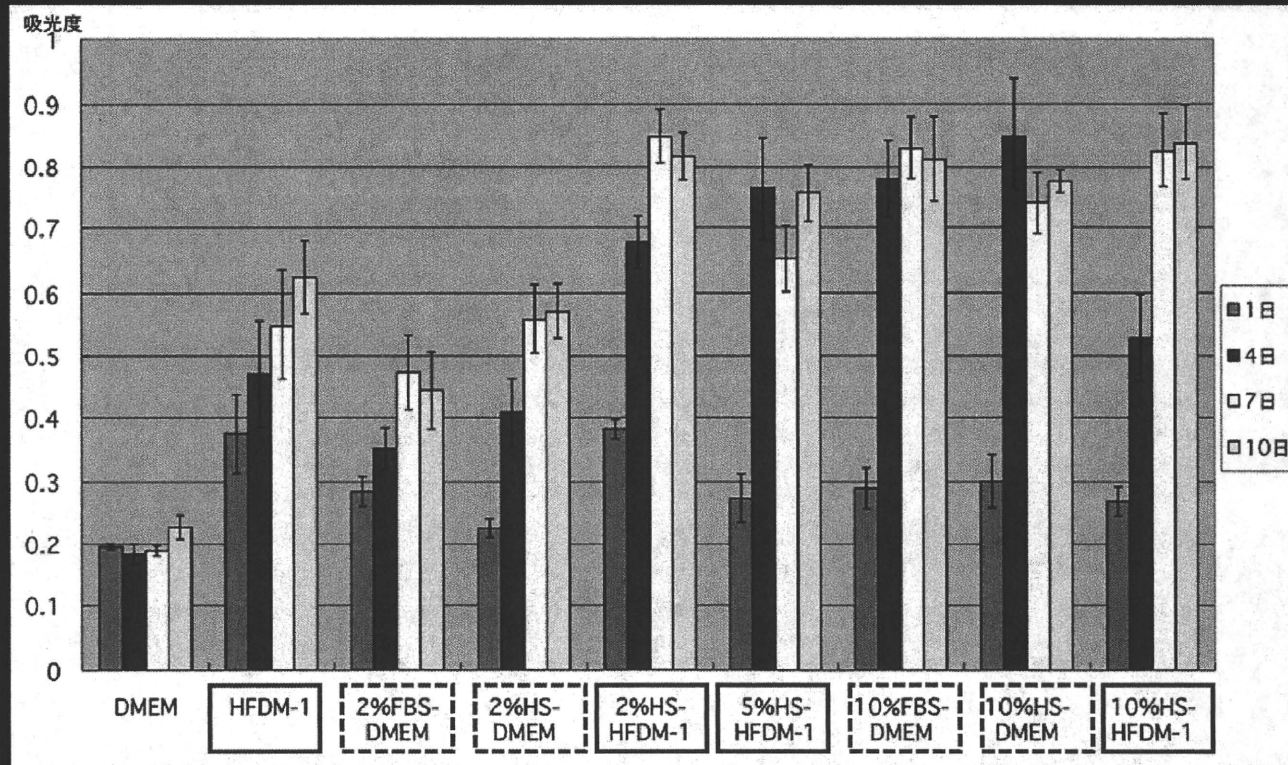
無血清線維芽細胞増殖培地 (HFDM-1)

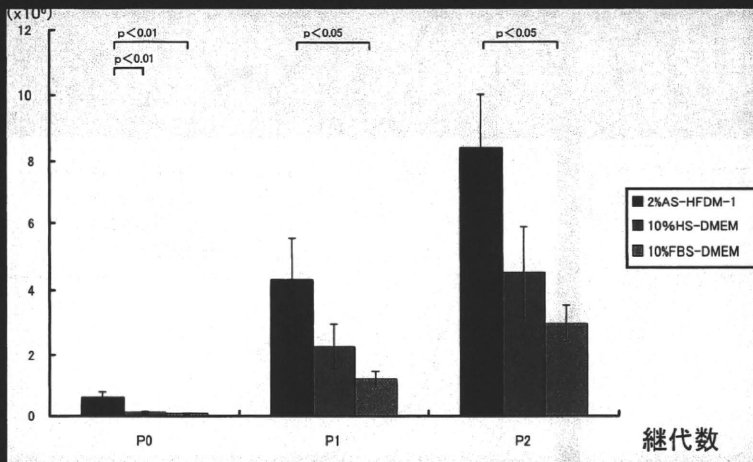
(機能性ペプチド研究所)

- ・GMPグレード
- ・完全合成培地、動物由来成分は含まない
- ・添加物はrecombinant insulin, recombinant EGF
- ・無血清でも線維芽細胞の増殖が可能だが、0.5%HS(ヒト血清)を添加すると、FBS10%添加以上の細胞増殖がみられる。

2%自己血清添HFDM-1培地での検討を行った。

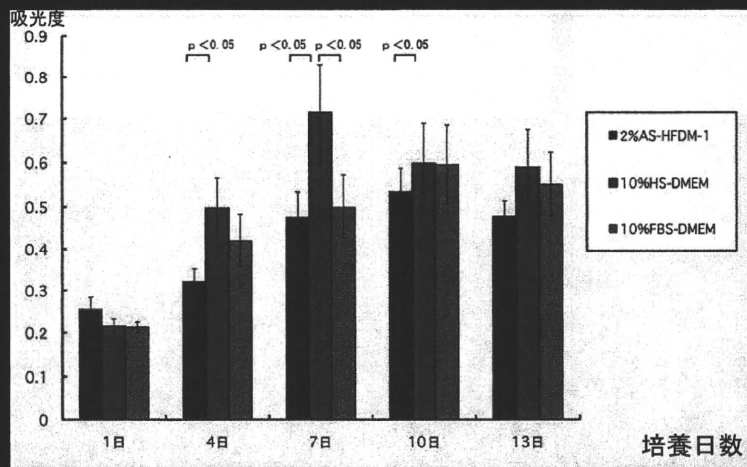
血清濃度による細胞増殖比較(スポンジ播種後)





自己血清での培養

初代培養(真皮より)



人工真皮播種後

Morimoto N. et al. The utilization of animal product-free media and autologous serum in an autologous dermal substitute culture. J Surg Res. in press

培地の問題

2%自己血清添加HFDM-1培地を用いる。
培地量は500ml程度、血清は10ml程度で培養真皮1枚作製可能

糖尿病性潰瘍

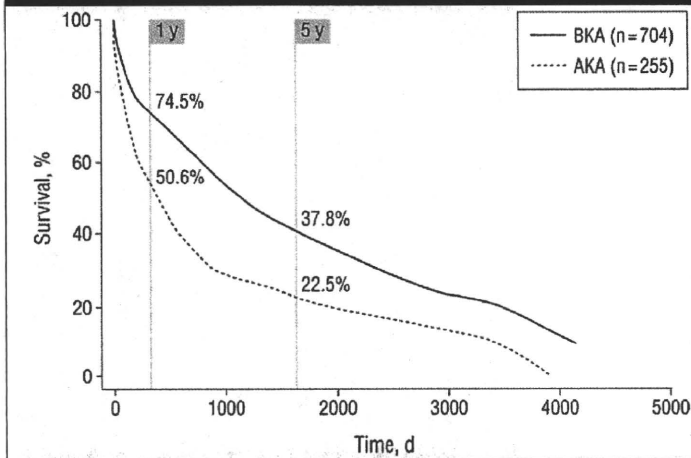


Figure 1. Actuarial survival in below-knee amputation (BKA) patients vs above-knee amputation (AKA) patients ($P<.001$).

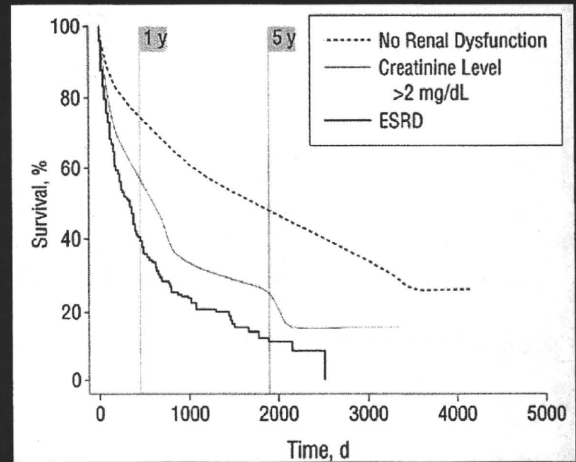


Figure 3. Actuarial survival according to renal function ($P<.001$). ESRD indicates end-stage renal disease. To convert milligrams per deciliter to micromoles per liter, multiply by 88.4.

Major lower extremity amputation: outcome of a modern series.

Aulivola B, et al. Arch Surg. 2004 Apr;139(4):395-9; discussion 399.

大切断に至る糖尿病性潰瘍は生命予後も非常に悪く、救肢必要

試験名

第 I - II 相臨床試験

「自家培養真皮を用いた糖尿病性潰瘍に対する
創床形成療法の安全性と臨床効果の検討」

試験デザイン: 非ランダム化、単群、オープン試験

自家培養真皮貼付回数: 1回

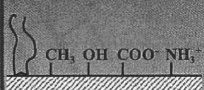
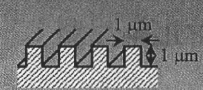
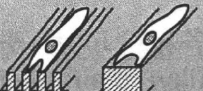
目標症例数: 11例

材料表面への細胞の接着

再生医科学研究所 岩田 博夫

iwata@frontier.kyoto-u.ac.jp

合成高分子と生体との相互作用

	小				大		
	溶解鎖	ナノ粒子	微小片	ゲル	バルク材料	微細加工表面	デバイス
特性	 水溶性 分子量 電荷	 大きさ 濡れ性 電荷	 エッジの鋭さ 濡れ性 電荷	 含水率 架橋点間距離	 CH_3 OH COO^- NH_4^+ 濡れ性 電荷	 細胞との相対的 大きさ エッジの鋭さ	 動き 耐久性
タンパク	タンパクの凝集				補体系の活性化		
細胞・組織 反応	 ピノサイトーシス 細胞内消化 細胞外反応？	 ファゴサイトーシス 細胞内消化 細胞外反応？	 アジュバント効果 細胞内消化 免疫反応 持続的炎症反応	 結合組織の 形成	 細胞の接着 結合組織の形成	 細胞の配列 マクロ形状	力学的適合性
生体外への 排出ルート	腎臓から濾過	？	？	結合組織による カプセル化	結合組織によるカ プセル化	固着による共存	摘出
医工学への 応用	遺伝子治療 免疫反応の制御 イメージング	DDS イメージング	DDS	コンタクトレンズ Bio人工臓器	人工臓器用材料 バイオセンサー 組織工学用材料	人工関節の緩みの 防止 組織工学用材料	人工臓器 治療用デバイス

高分子表面の不安定性

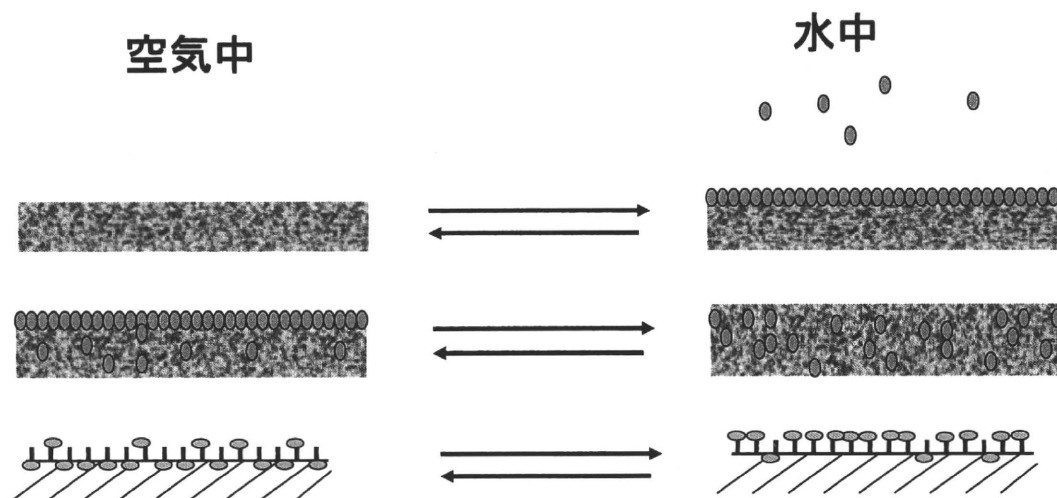
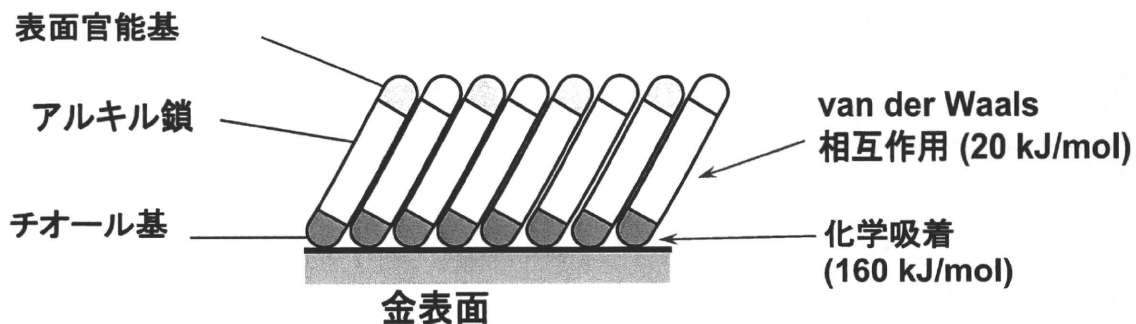


図 高分子表面は環境変化に応じて変化する。(A):溶液中の添加物が表面に吸着、(B);酸化防止剤などの添加物の表面への濃縮、(C);表面グラフト高分子鎖の表面上での沈殿と、表面層への侵入。

アルカンチオール自己組織化膜によるモデル表面の作成



各種アルカンチオール
Alkyl chain: $-(CH_2)_{11}-$



4. 細胞との相互作用

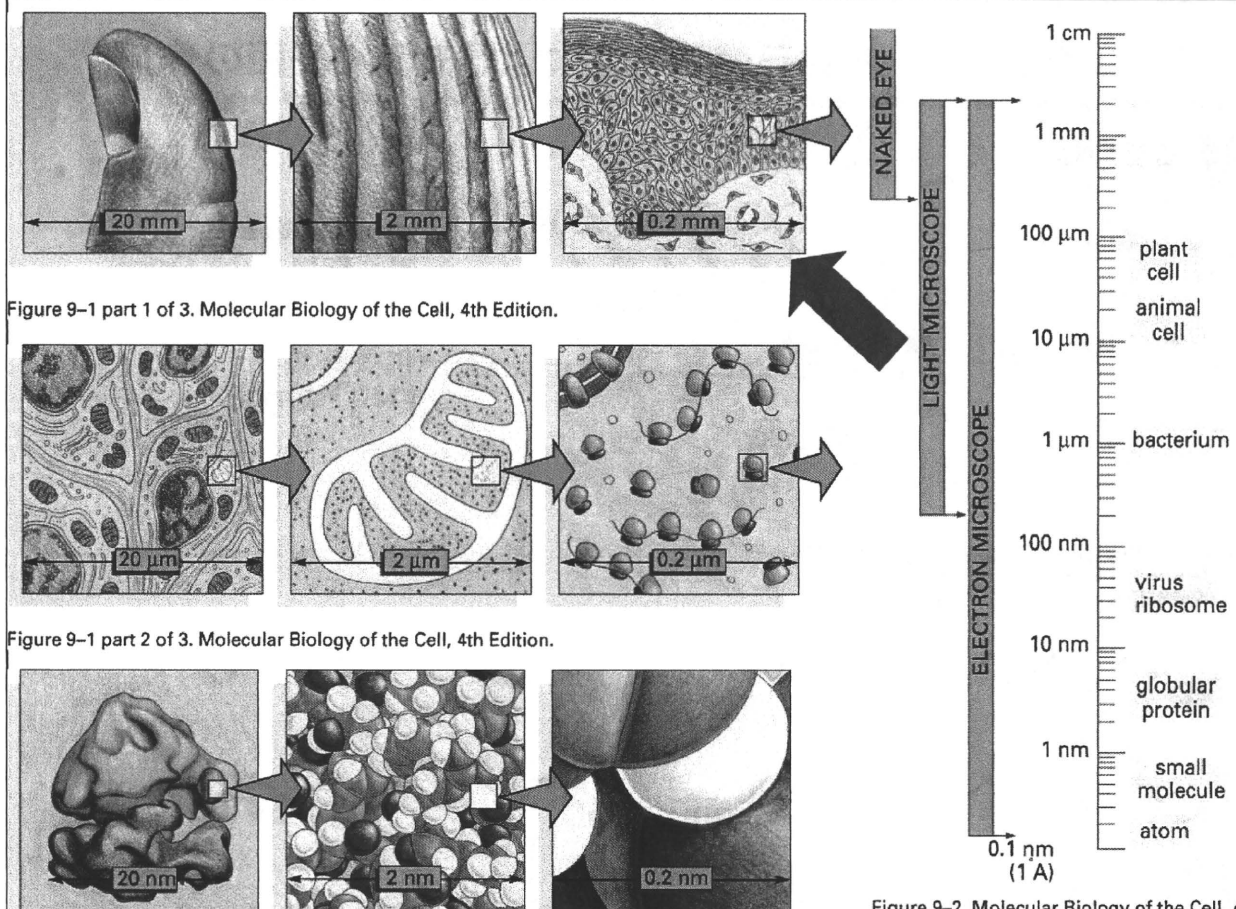
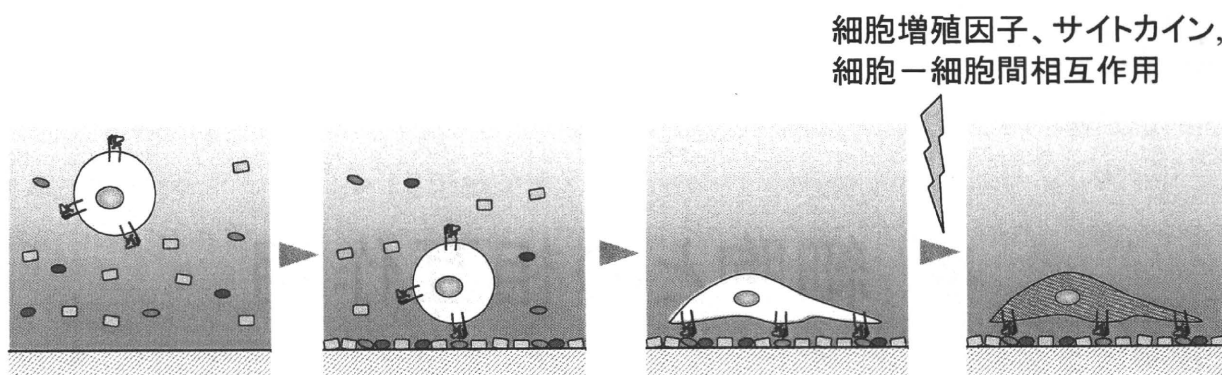


Figure 9-2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

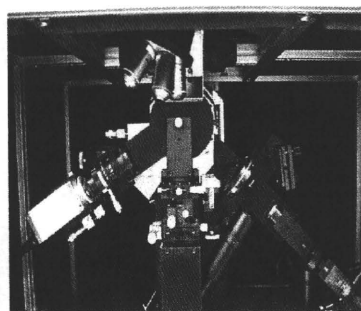
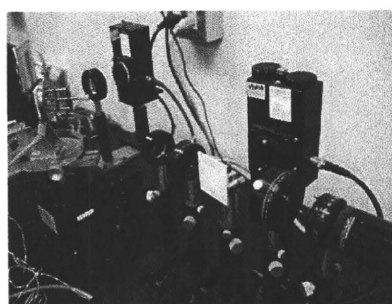
材料表面への細胞接着のモデル



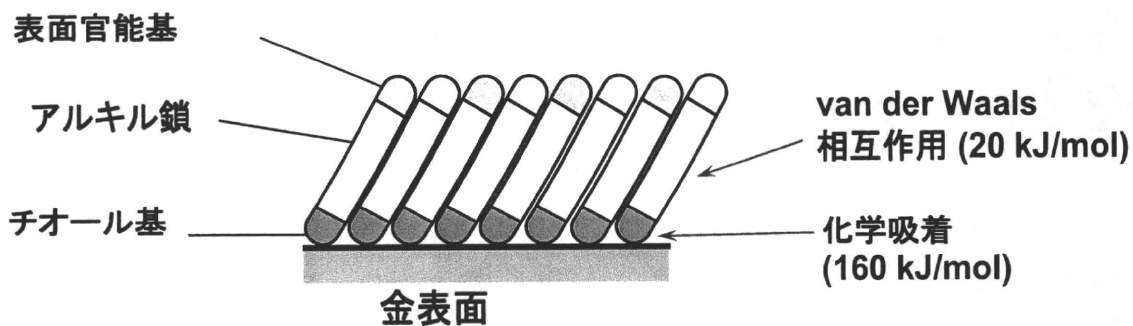
細胞接着の開始

表面プラズモン共鳴

全反射顯微鏡



アルカンチオール自己組織化膜によるモデル表面の作成



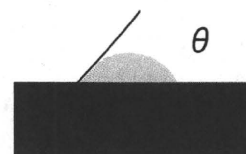
各種アルカンチオール
Alkyl chain: $-(\text{CH}_2)_{11}-$



モデル表面と細胞の準備

基盤: Cr: 1 nm
Au: 10 nm } on S-LAL10 ($n = 1.72$)

→ $\left. \begin{array}{l} \text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3 \\ \text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{OH} \\ \text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH} \\ \text{HS}(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+\text{Cl}^- \end{array} \right\} \text{の1 mM エタノール溶液}$
24 hr



水接触角

CH ₃	108.6 ± 0.3
OH	29.0 ± 0.6
COOH	22.7 ± 0.9
NH ₂	52.9 ± 2.3

細胞: 臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)

細胞サスペンション

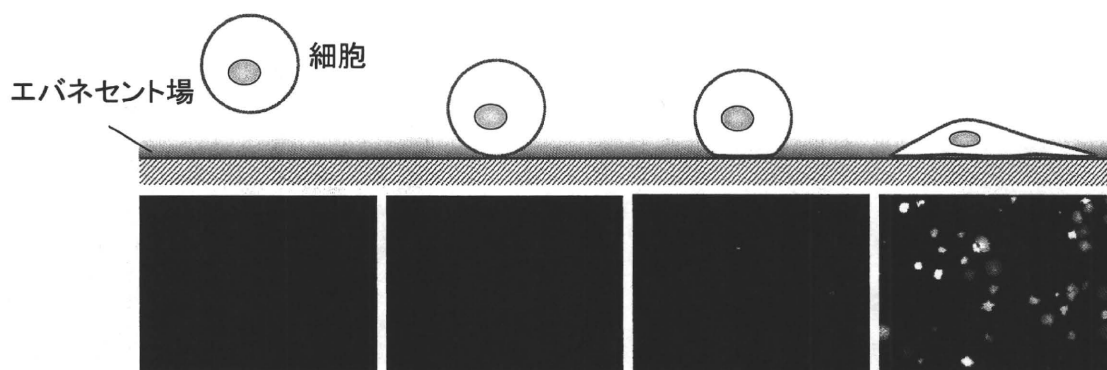
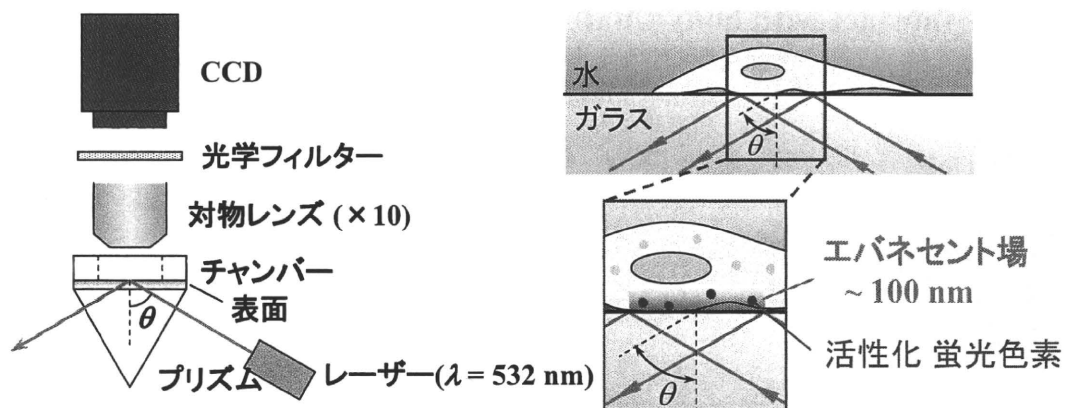
→ 細胞膜蛍光色素PKH-26で染色

($\lambda_{\text{ex}} = 551 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 567 \text{ nm}$)

→ 自己組織化膜上へ細胞を播種 ($2 \times 10^4 \text{ cells}/2.5 \text{ cm}^2$)

細胞培養液: EBM-2 (Clonetics) + 2% FBS + 20 mM HEPES

全反射顕微鏡 (TIRM)



	10 min	30 min	60 min	180 min
CH ₃				
OH				
COOH				
NH ₂				

タンパク吸着

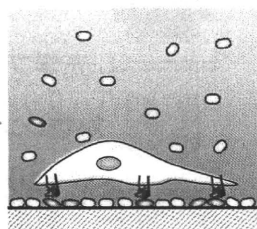
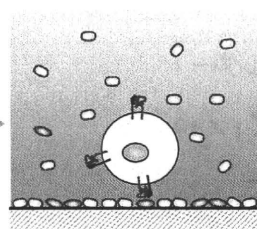
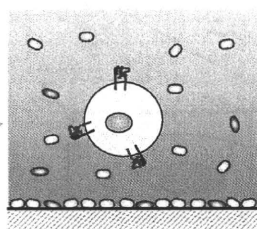
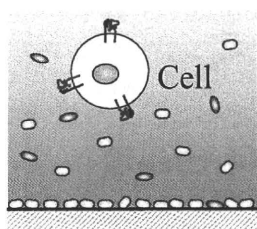
Biomaterials interact with body fluid

細胞 培養液中

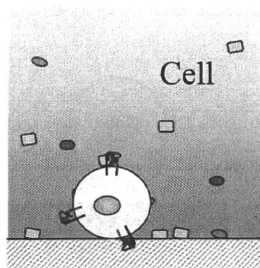
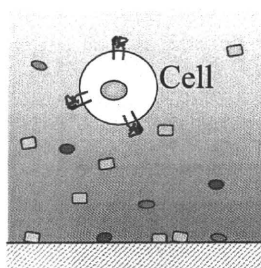
表面へ

接着

伸展

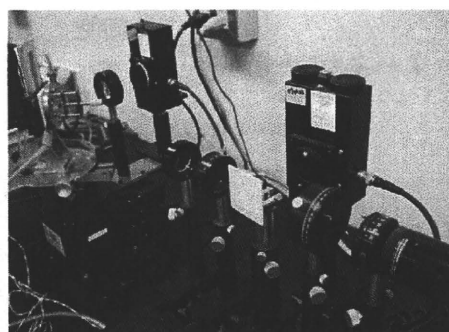


タンパクの吸着



細胞が直接表面と相互作用？

タンパク吸着
表面プラズモン共鳴 (SPR)

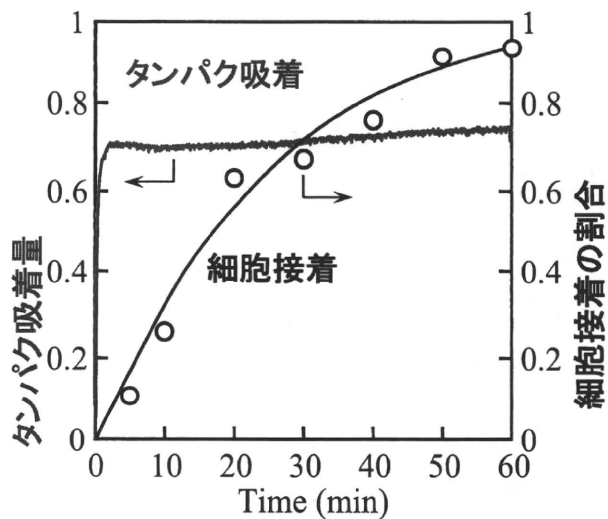


タンパク吸着と細胞接着

基盤: NH_2 -SAM, Cells: HUVEC

培養液: EBM-2 + 20 mM HEPES + 2% FBS

タンパク吸着: 表面プラズモン共鳴



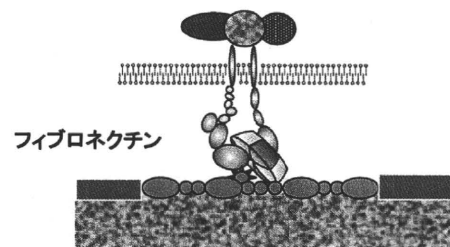
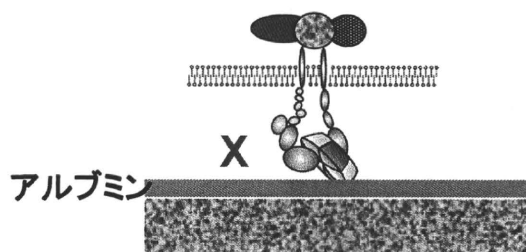
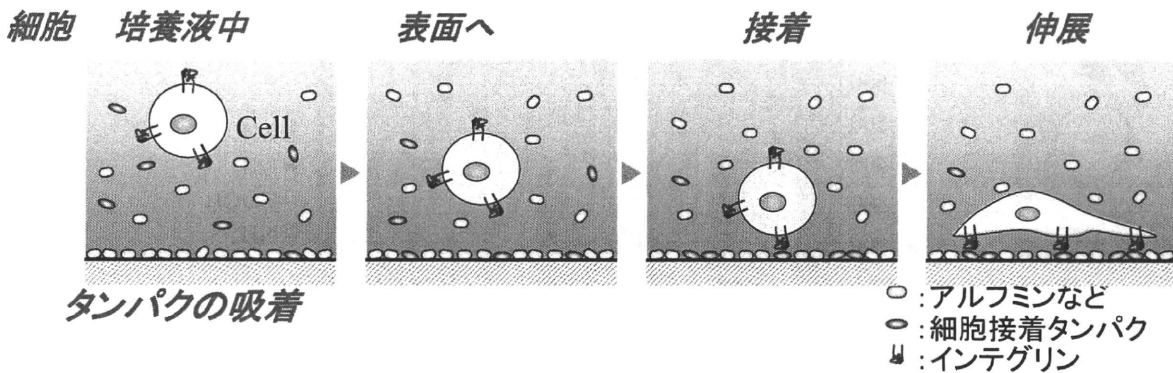
血清中のタンパク組成

血清タンパク	濃度
アルブミン	35-50 mg/mL
IgG	8-18 mg/mL

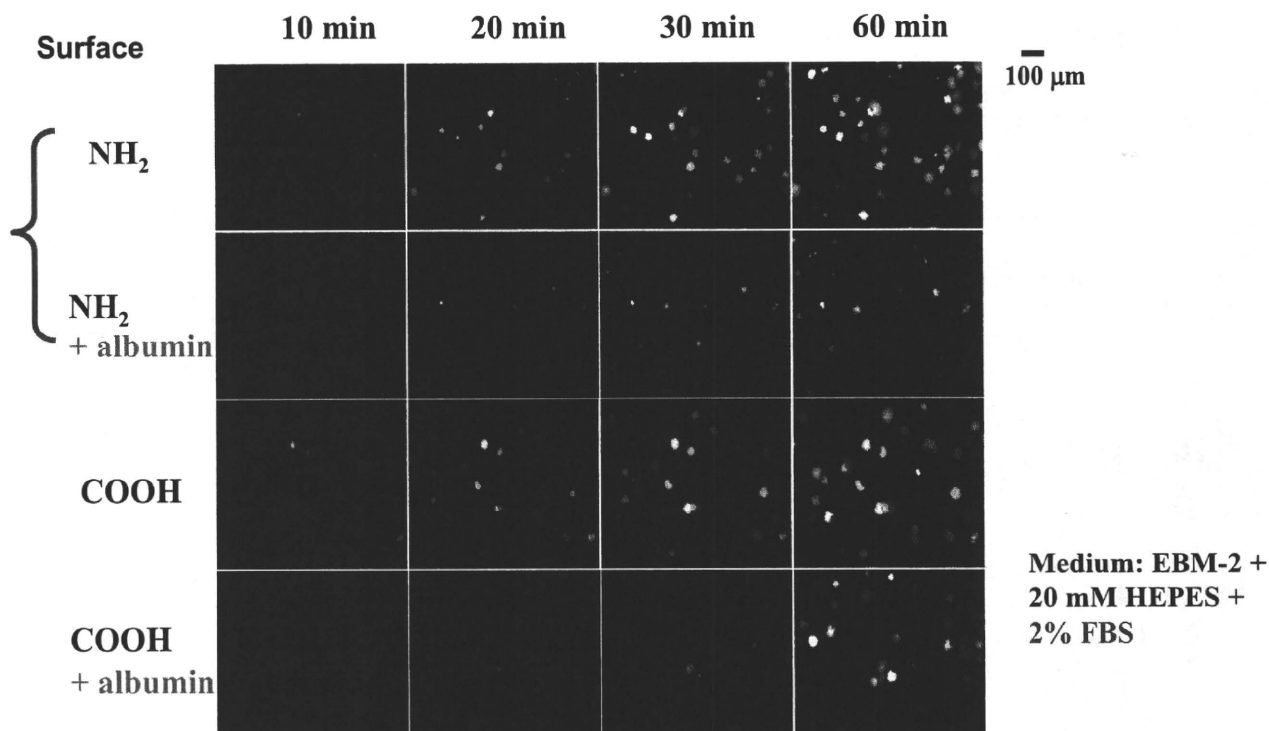
細胞接着タンパク

ビトロネクチン	200 $\mu\text{g/mL}$
フィブロネクチン	30 $\mu\text{g/mL}$

基板上のタンパク吸着層上に細胞が接着

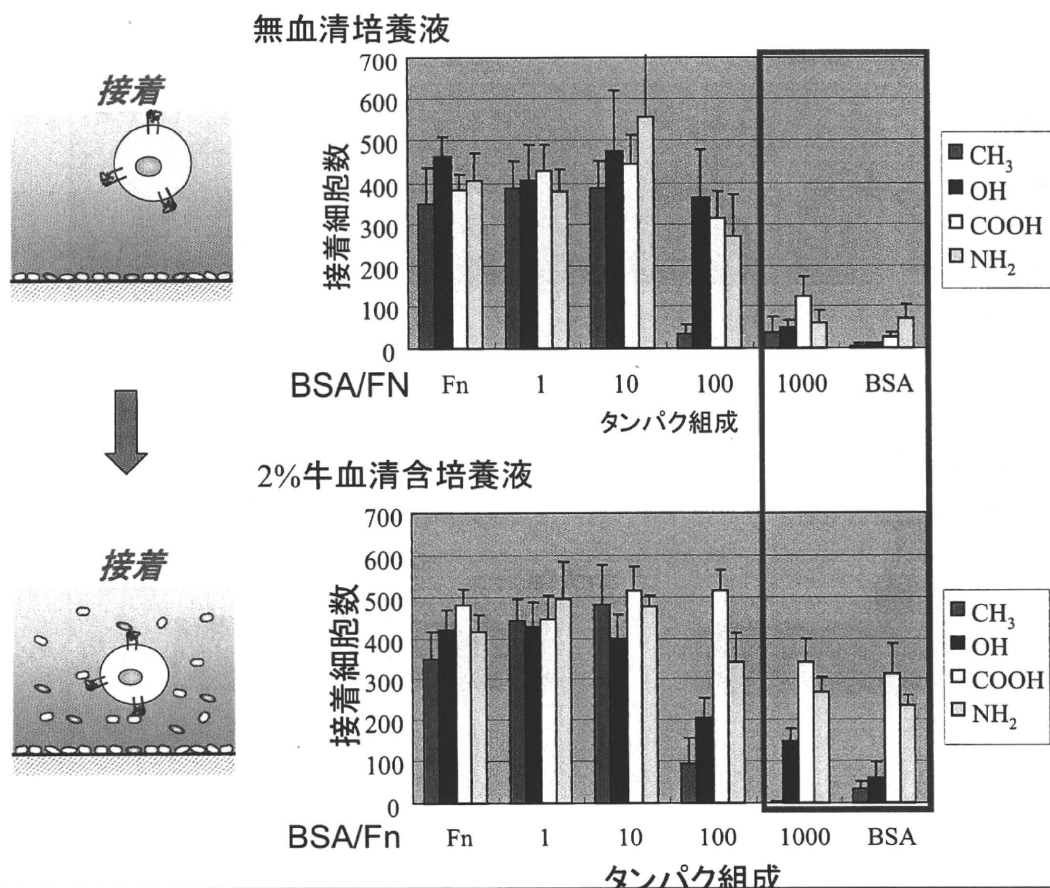


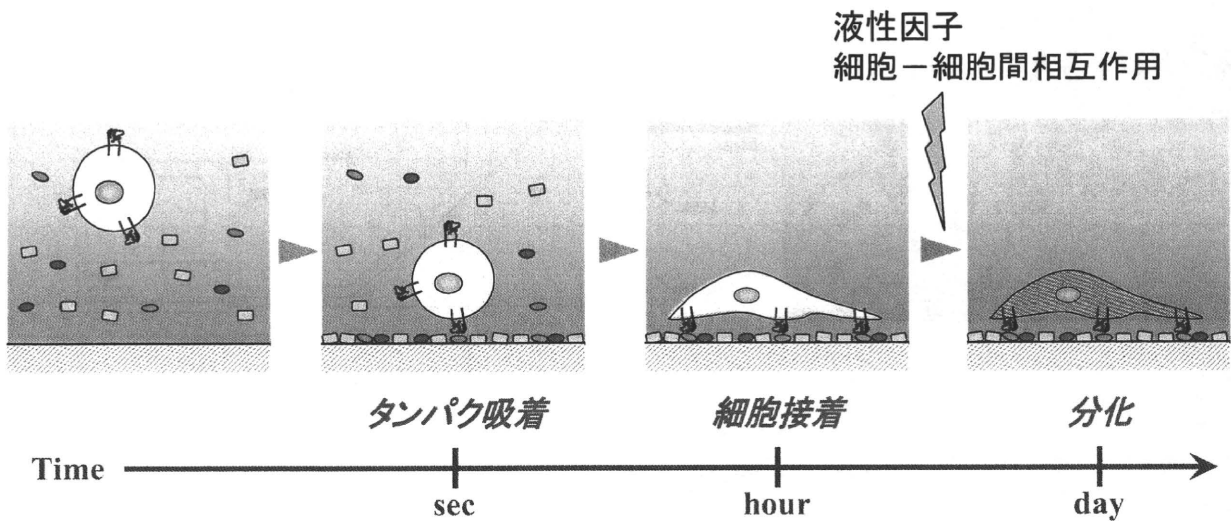
Replacement of serum albumin pre-adsorption with Cell adhesion proteins



- Displacement of preadsorbed albumin with adhesive proteins induces cell attachment to the COOH- and NH₂-SAMs with a preadsorbed albumin layer.

BSA/Fn 混合液で処理たでSAMs へのHUVE





目的: 表面-タンパク質-細胞の逐次階層構造を理解し, 生体材料開発の基礎知見を提供する

4. タンパク質との相互作用

- タンパクの非特異的吸着
- 血液凝固系の活性化
- 補体系の活性化

表面プラズモン共鳴(SPR)装置

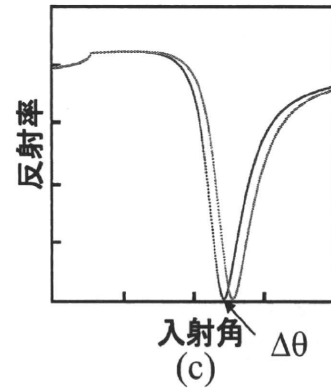
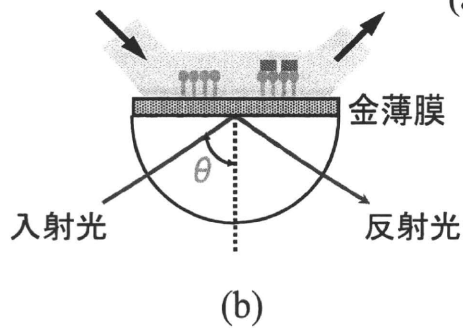
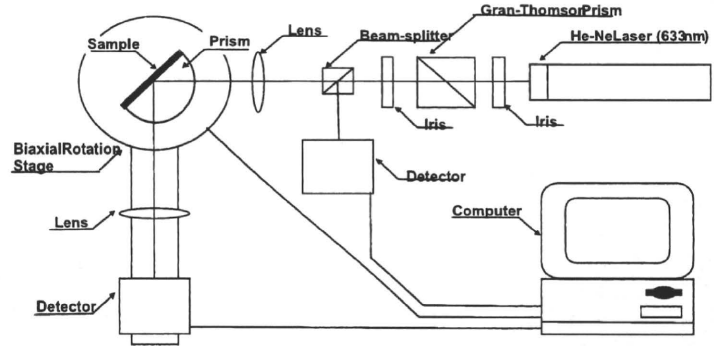
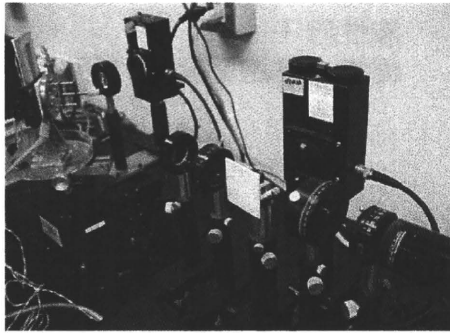


図 表面プラズモン共鳴(SPR)装置の一例。金薄膜の背面から p 偏光を入射させる。入射角を変化させながら反射光強度変化を測定する。共鳴角の変化から表面への吸着量を算出することができる。

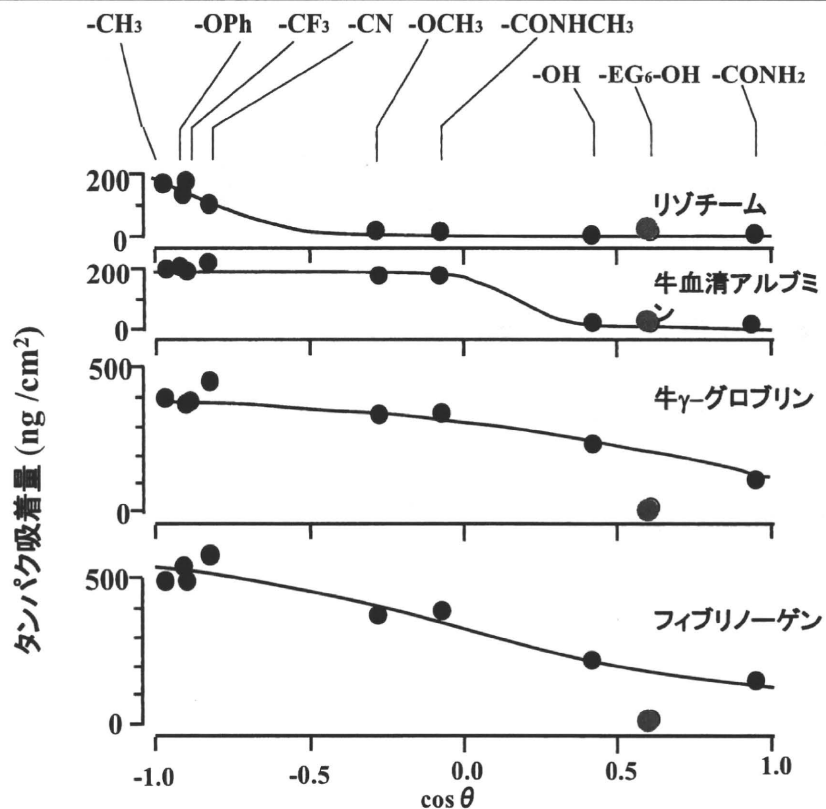


図 種々の官能基を有する自己組織化単分子膜表面へのタンパクの吸着。横軸はシクロオクタン中での水接触角。リン酸生理食塩水に1.0 mg/mL濃度になるように溶解したタンパク溶液を20分間流した後の吸着量。図中●は末端が $-(O-CH_2-CH_2)_6OH$ のアルカンチオールを用いて調製された自己組織化単分子膜表面の値である。文献4のの図8を改変。

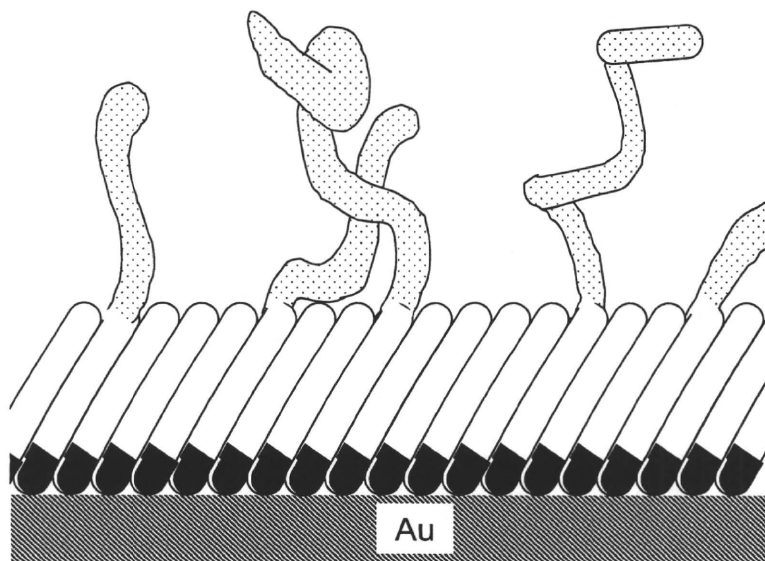


図 オリゴエチレングリコール有するアルカンチオールと片末端メチル基のアルカンチオールの混合溶液より調製された自己組織化単分子膜の模式図。

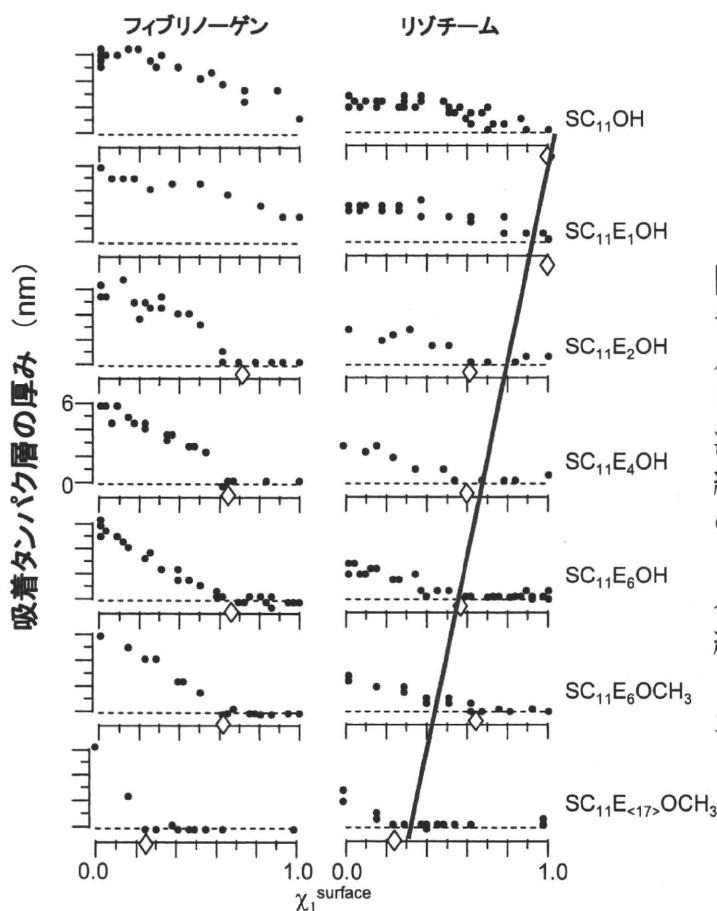
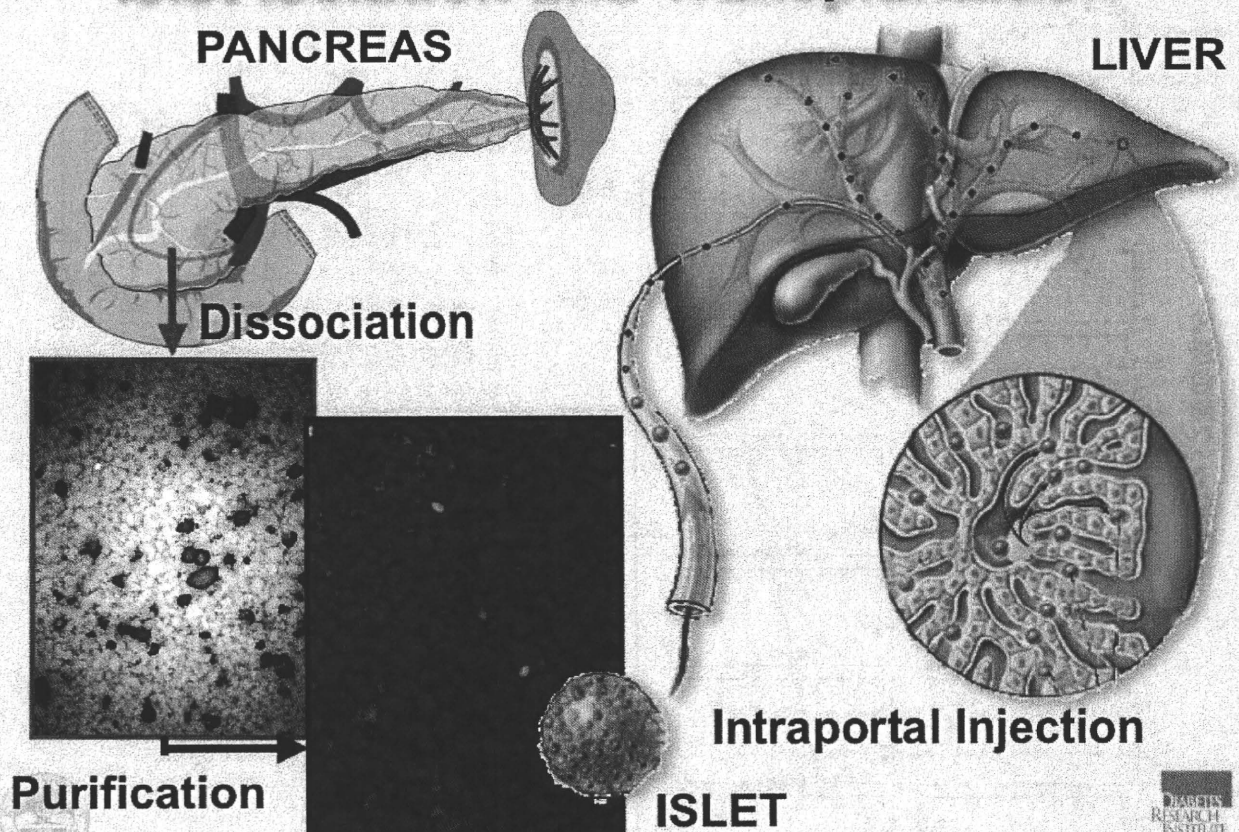


図 各種長さの異なるオリゴエチレングリコール鎖を有するアルカンチオールと末端メチル基を有するアルカンチオールとの混合溶液より調製された自己組織化単分子膜表面へのタンパクの吸着。縦軸はエリプソメトリーにより測定された吸着タンパク層の厚さ。横軸は混合自己組織化単分子膜中のオリゴエチレングリコール鎖アルカンチオールのモル分率。文献8の図2より。

糖尿病の細胞療法

Islet Isolation and Transplantation



Islet transplantation

Immune competent cells, Antibodies,
Complement proteins

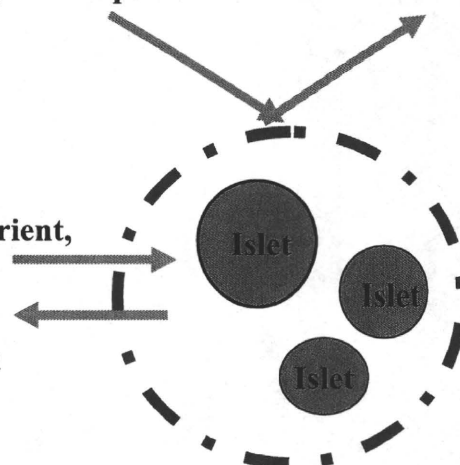


Bioartificial pancreases

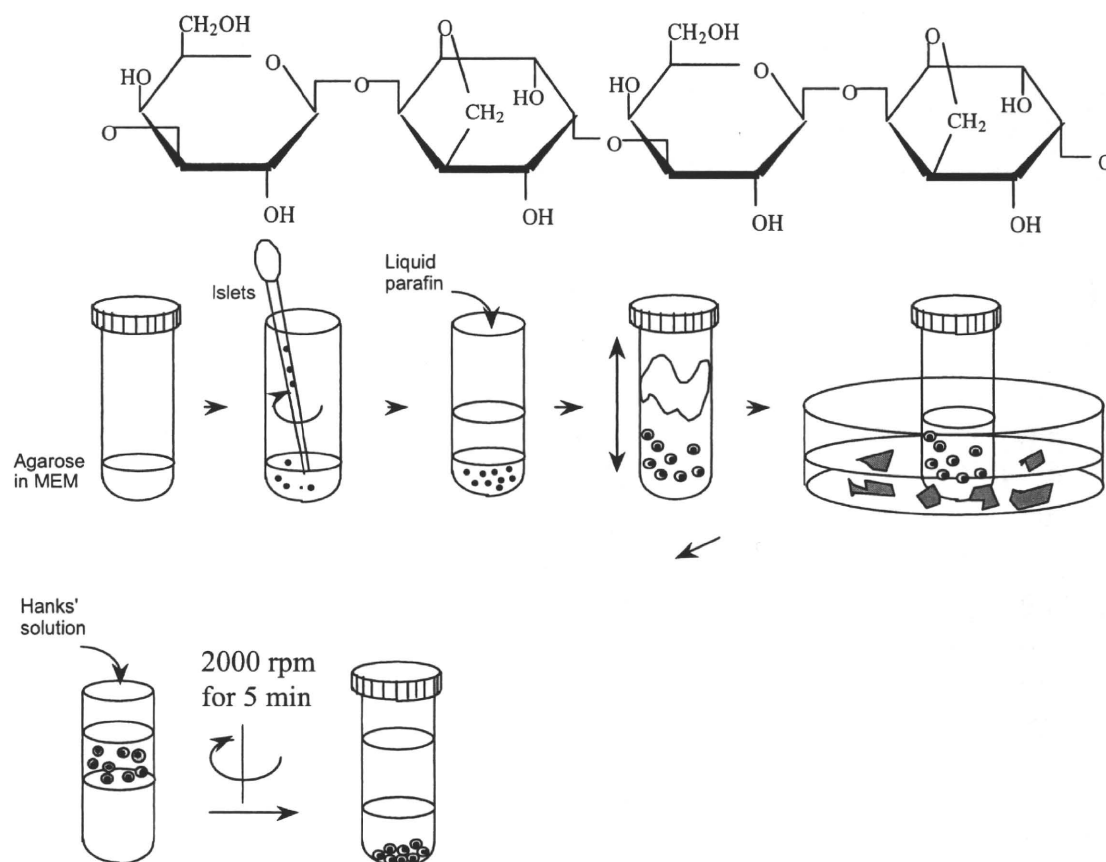
Immune competent cells, Antibodies,
Complement proteins

Oxygen, Nutrient,
Glucose

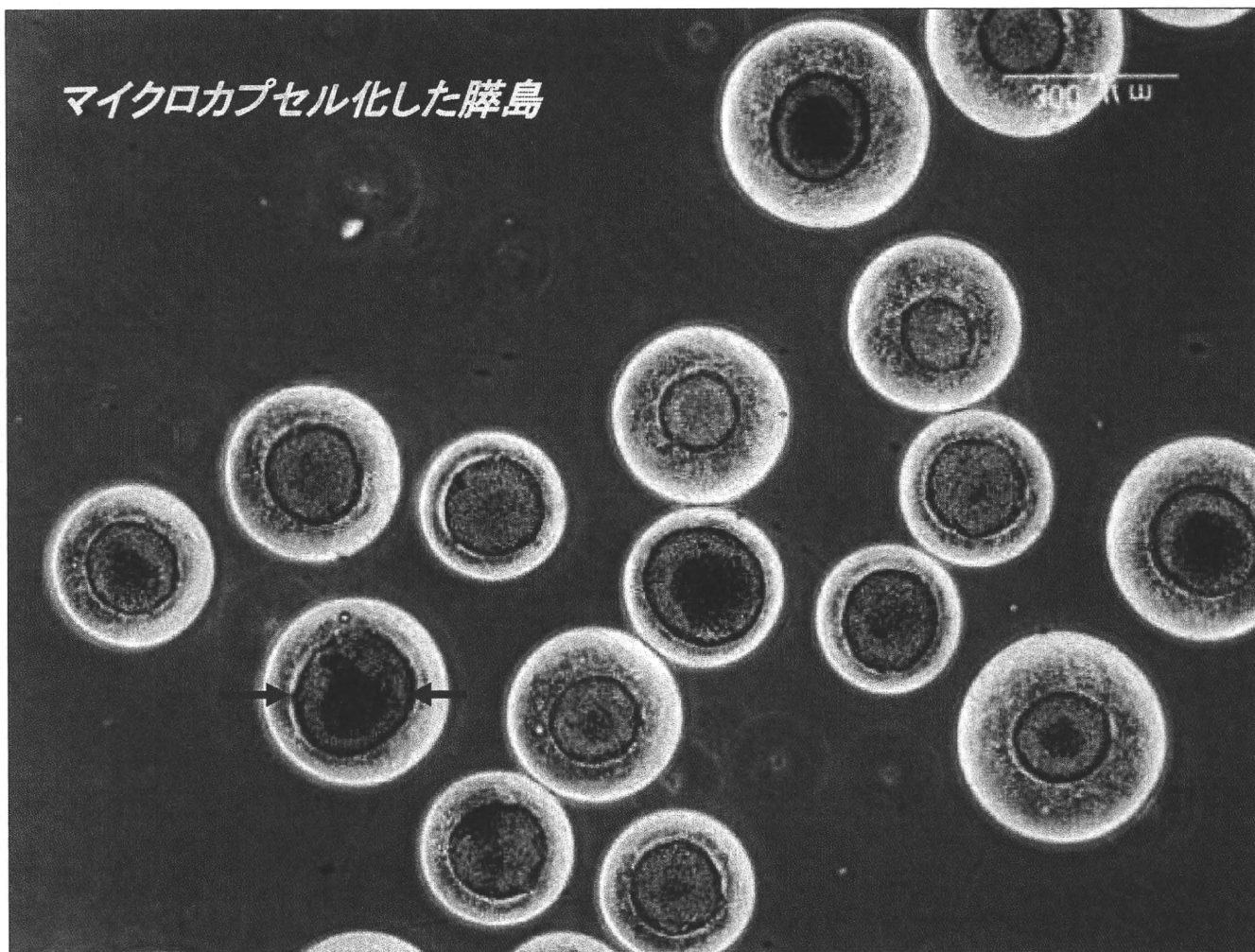
Insulin



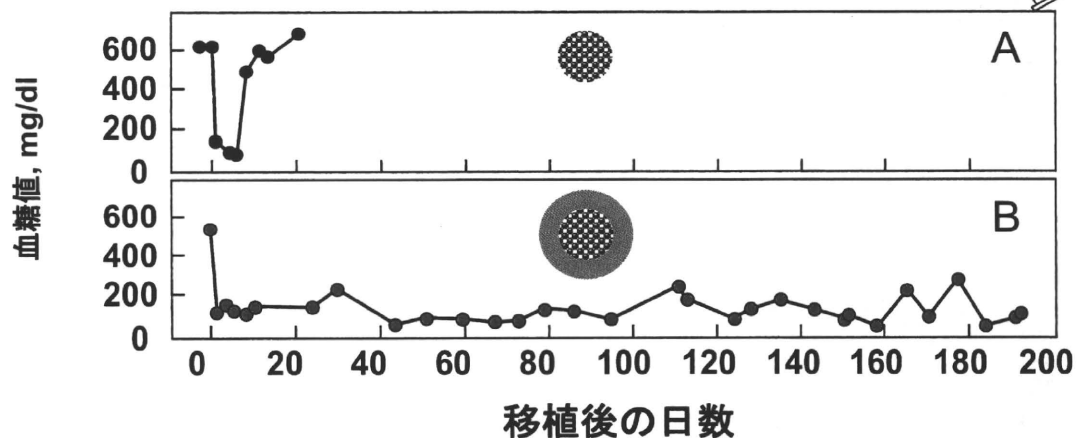
膵島のアガロースマイクロカプセルへの封入



マイクロカプセル化した膵島



バイオ人工膵臓の有効性



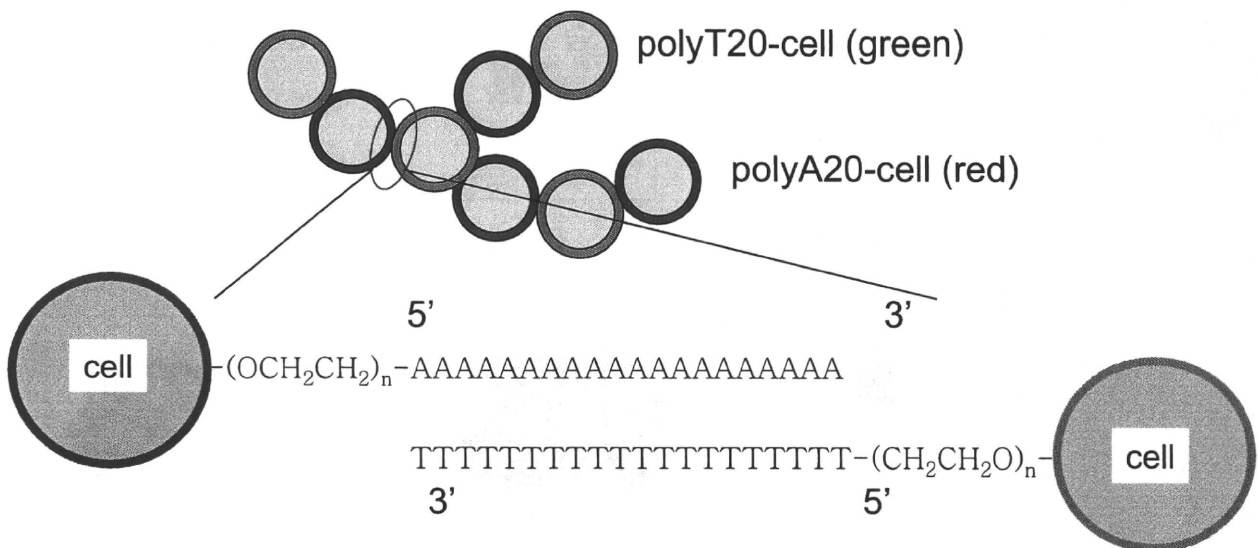
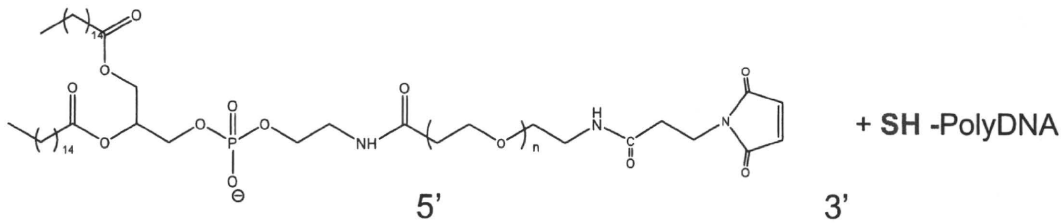


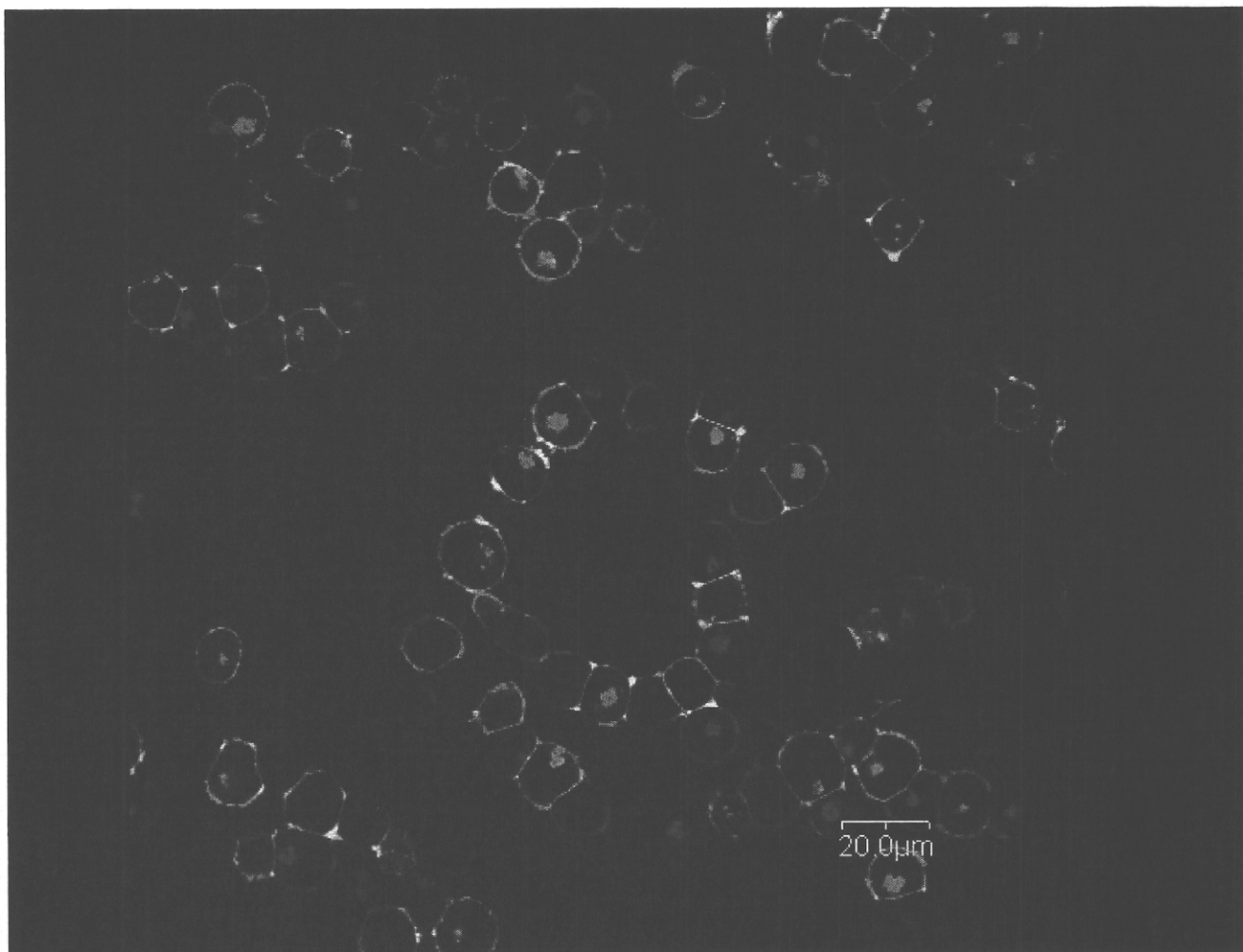
要求性能
血液適合性がいい
膵島を拒絶反応から保護
極薄膜



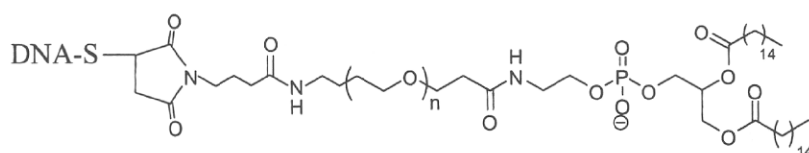
膵島を患者の内皮細胞で覆う

PolyDNA-PEG-lipid





(a)



polyA20: HS-5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA-3'

polyT20: HS-5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

(b)

