

3Ba05 繊維性スキャフォールドによるハイブリッド型人工肺の基礎検討

○村井 正広¹, 幡多 徳彦², 野口 展士³, 野中 一洋⁴, 舟久保 昭夫^{1,3}
(¹電機大院・理工,²電機大・フロンティア共研セ,³電機大院・先科技,⁴McGowan Inst. Univ. Pittsburgh)
12rmb36@ms.dendai.ac.jp

【目的】

現在、臨床に用いられる多くの人工肺は人工材料で構成されている。それゆえ、血栓形成、生体適合性、炎症反応のような問題がある。そこでエレクトロスピンニング法を用いて細胞の足場を構築し、細胞による生体組織を模擬したハイブリッド型人工肺を構築することでこれらの問題を解決できると考えている。本研究では、繊維性スキャフォールドと細胞を用いたハイブリッド型人工肺の開発を目的とした。

【方法・結果】

繊維性スキャフォールドは、医療用材料として広く用いられているセグメント化ポリウレタン (SPU) を用いてエレクトロスピンニング法により繊維性スキャフォールドのシートを作製した。また、繊維性スキャフォールド上で細胞を培養しガス交換能を測定した。光造形機を用いて血液とパーフルオロカーボン (PFC) を流すための二つの流路を有するチャンバーを作製した。繊維性スキャフォールドのシートに細胞を培養した後、作製したチャンバーに細胞培養したスキャフォールドのシートをセットし、繊維性スキャフォールドと細胞によるハイブリッド型人工肺ガス交換能について検討を行った。

Basal study on hybrid artificial lung with fibrous scaffolds

○Masahiro Murai¹, Norihiko Hata², Hiroo Noguchi³, Kazuhiro Nonaka⁴, Akio Funakubo^{1,3}
(¹Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Denki Univ., ²FRDC. Tokyo Denki Univ., ³Grad. Sch. Adv. Sci. Tech. Tokyo Denki Univ., ⁴McGowan Inst. Univ. Pittsburgh)

Key words tissue engineering, fibrous scaffold, electrospinning, segmented polyurethane

3Ba07 骨髄間葉系幹細胞を用いた収縮のないスキャフォールドフリー軟骨様細胞シートの作製

○佐藤 康史¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能,²武庫女大院・健康スポ)
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) を用いた関節軟骨の再生医療研究の中でも、スキャフォールドフリー組織作製法が注目されている。我々は隔膜培養器であるセルカルチャーインサート内で MSC を培養することによりスキャフォールドフリー軟骨様細胞シートを作製する方法を報告したが、培養中に細胞シートが収縮することがあり、今回収縮を起こさないシート培養法を検討した。さらに培養工程で動物由来成分を除去した方法での軟骨様細胞シート作製も検討した。

【方法】通常の増殖培地 (10% FCS) または無血清増殖培地で増殖させたヒト骨髄 MSC を、TGF-β3、IGF- I などを含む無血清軟骨分化培地や、これらを基本とする種々の改変培地を用いて、セルカルチャーインサート (0.3 cm², 孔径 0.4 μm) に播種し、37℃、5% CO₂ 雰囲気下で3週間静置培養を行った。

【結果と考察】無血清軟骨分化培地で培養すると培養7日目までに細胞シートが収縮し球状になった。また、増殖培地を用いた場合、収縮はしないが、シートが0.1 mm 以下と薄いため、シートを膜から回収できなかった。一方、無血清軟骨分化培地と増殖培地を1:1 で含む混合培地で培養すると収縮せず、直径約 6.4 mm、厚さ約 0.6 mm の円盤状の軟骨様細胞シートを回収できた。また、FCS をヒト血清に変えた混合培地を用いた場合でも、軟骨特異的遺伝子の良好な発現が認められ、アルシアンブルー陽性の軟骨様細胞シートを回収できた。

Preparation of scaffold-free cartilage-like sheet made of mesenchymal stem cells without FCS

○Sato Yasushi¹, Wakitani Shigeyuki², Takagi Mutsumi¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. Health Sports Sci., Mukogawa Women's Univ.)

Key words cartilage regeneration, mesenchymal stem cell, scaffold-free, cell sheet

3Ba06 放射線架橋コラーゲンゲル上におけるラット間葉系幹細胞の分化特性の解析

○森 英樹, 池中 亮裕, 清水 公亮, 原 正之
(阪府大院・理・生物科学)
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

【目的】放射線照射による高分子の架橋は電線被覆材料の改良など産業的に利用されている。酸性条件下で抽出されたコラーゲンの溶液にガンマ線を照射すると分子間が架橋され比較的柔軟で透明なゲルを作製することができる。我々はこれまでにガンマ線架橋ゲルの力学的特性や細胞接着性について研究してきた。本研究では、ガンマ線架橋ゲルの細胞親和性を確認するためにラット骨髄由来の間葉系幹細胞 (rMSC) を用いてガンマ線架橋ゲル上への接着と分化挙動を解析した。

【方法・結果】ガンマ線架橋コラーゲンゲルは5% I 型コラーゲン溶液に5 kGy のガンマ線照射後、MEM培地中に2日間浸すことによって調製した。細胞は37℃、CO₂ 5% 条件下で10% FBS を含む MEM 培地中で培養した rMSC を用いた。実験には対照として細胞培養用ポリスチレン面、5% I 型コラーゲン溶液を中和することによって得られる線維化コラーゲンゲル、ガンマ線架橋コラーゲンゲルを調製し、それらの材料上へ rMSC を播種後、骨及び脂肪細胞への分化誘導を行った。分化誘導後の細胞をアルカリフォスファターゼ染色、アリザリンレッド染色によって骨分化を、オイルレッド染色によって脂肪分化を評価した。rMSC は播種後、ガンマ線架橋ゲル上に接着し伸展した。骨分化、脂肪分化誘導共にポリスチレン表面よりはガンマ線架橋コラーゲンゲルの方が分化誘導された細胞の割合は高かったが、線維化コラーゲンゲルと比べると低い傾向がみられた。

Differentiation of rat mesenchymal stem cells on collagen hydrogels cross-linked by gamma-ray irradiation

○Hideki Mori, Akihiro Ikenaka, Kousuke Shimizu, Masayuki Hara
(Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, differentiation, collagen gel, gamma ray

3Ba08 間葉系幹細胞とβ-TCPを用いた骨軟骨様構造体における軟骨層の厚み増大

宮城 重治¹, ○藤原 政司¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能,²武庫女大院・健康スポ)
takagi-m@eng.hokudai.ac.jp

【目的】関節軟骨欠損の再生治療に関して、間葉系幹細胞 (MSC) を用いたスキャフォールドフリー軟骨様シートの生着改善を目指し、軟骨様シートにβ-TCP (β-tricalcium phosphate) ブロックを組み合わせた骨軟骨様構造体の作製法を検討することを目的とした。

【方法】軟骨分化用培地を用い、ヒト骨髄由来 MSC をセルカルチャーインサート (0.3 cm², 孔径: 0.4 μm) に入れ、37℃、5% CO₂ 雰囲気下でシート培養を開始した。1 日後にβ-TCP (OSferion®, オリンパス) をシート上に載せてさらに21日間まで培養した。培養後、骨軟骨構造体の切片を作成し、厚み測定とアルシアンブルー染色を行った。

【結果と考察】得られた骨軟骨様構造体のβ-TCPブロック外の軟骨層が薄かった (0.13 mm) ため、細胞数を2倍 (37.2×10⁵ cells) に増加させて21日間培養した結果、ブロック内の軟骨層の厚みが増加した。しかし、ブロック外の厚みが増加しなかったため、MSCシートにβ-TCPブロックを載せて14日間培養後、培養開始一日後の別の MSC シートを積層させてさらに7日間培養した結果、細胞シート同士が結合し、β-TCPブロック外の軟骨層の厚みが積層無しの場合に比べて約3.95倍に増加した。これらの結果より、β-TCPブロック内、ブロック外の両方の軟骨層の厚みを増大させ得る可能性が示された。

Osteochondral-like tissue graft constructed with beta-TCP and mesenchymal stem cells

Miyagi Shigeharu¹, ○Fujiwara Masashi¹, Wakitani Shigeyuki², Takagi Mutsumi¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Grad. Sch. Health Sports Sci., Mukogawa Women's Univ.)

Key words mesenchymal stem cell, beta-TCP, cartilage regeneration, osteochondral-like tissue graft