A208 バイオリアクターを用いた血管 scaffold への細胞播種

Cell seeding onto vessel scaffold using bioreactor

○学 戸川 祐一（関西大）， 江橋 具（国立循環器病センター），
吉田 謙一（先端医療振興財団）， 藤里 俊哉（国立循環器病センター），
正 大場 謙吉（関西大）， 中谷 武嗣（国立循環器病センター）

Yuichi TOGAWA, Kansai University, 3-3-35, Yamate-cho, Suita-shi, Osaka

Tomo EHASHI, National Cardiovascular Center, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka

Ken'ichi YOSHIDA, Foundation for Biomedical Research and Innovation, 2-2, Minatojima Minamimachi

Chuo-ku, Kobe, Hyogo

Toshia FUJISATO, National Cardiovascular Center, Kenkichi OBA, Kansai University,

Takeshi NAKATANI, National Cardiovascular Center

1. 緒言

心停止者から提供された凍結保存心臓弁は、機械弁に比べ抗血栓性で、異種生体弁に比べ耐久性で、さらに両者に比べて抗感染性で長所を持っているとされる。しかしながら、特に若年者に用いた同種弁は、導管部分の狭窄や石灰化を特徴とする変化によって、比較的早く機能不全を起こすことも報告されている。そこで、我々は凍結保存同種弁から提供者由来の細胞成分や抗原性部位を除去し、コラーゲン線維や弾性繊維、基底膜などの構造マトリックスのみを用いた再生医療用心臓弁組織の開発を行っている。この心臓弁組織へレシピエントの自己細胞を組み込むことで、自己修復能や成長性を有する組織工学弁が創製できると期待できる。本報告では、弁組織に比べ、構造が単純である脱細胞化血管 scaffold への血管内皮細胞の播種について検討するとともに、循環型バイオリアクターによる培養についても検討した。

2. 実験方法

2.1 脱細胞化 scaffold

クラウン系ミニブタ（ジャパンファーム）から大動脈を摘出し、超高静水圧印加処理（神戸製鋼）を行い、生理食塩水ベースの洗浄液処理にてドナー細胞を除去した組織を scaffold として用いた。

2.2 細胞培養

本実験ではヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた。培養には EBM(Endothelial Cell Basal Medium-2)に 2 %FBS および添加因子を加えた培養液を用いた。

2.3 血管 scaffold への細胞播種・培養

アクリルで作製したモジュール内に細胞懸濁液と血管 scaffold を入れ密閉し、図 1 に示した回転型バイオリアクターを用いて、4 時間、縦回転と横回転を同時に行うことで HUVEC を血管 scaffold 表面に播種した。その後、細胞を播種した scaffold を、ガス交換能を有するカルチャーバッグに入れ、1 日間静置状態で培養し、さらに図 2 に示す閉鎖回路を用いた循環型バイオリアクターで培養を継続した。この時、scaffold を二つに切り、循環培養と静置培

養の 2 種類の培養方法の比較をおこなった。循環型バイオリアクターはローラーポンプを使用しており、流速は 9.95×10^{-3} [m/s]、培地量は 300 ml で実験を行った。

Figure 1. Image of Rotating bioreactor.

Figure 2. Schematic diagram of Circulation bioreactor.

2.4 評価方法

血管 scaffold 表面の細胞をトルイジンブルー染色し、実体顕微鏡で観察した。

Calcein-AM と PI(Propidium Iodide)で生細胞と死細胞を同時に染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて血管 scaffold 表面の細胞が生存しているかの確認を行った。

3. 結果と考察

図3に1日間静置培養した後の血管 scaffold 内壁表面のトルイジンブルー染色画像を示す。HUVEC を播種した血管 scaffold を1日間静置培養することで、血管 scaffold 内壁に HUVEC を付着させることができた。

図4は静置培養1日間、循環培養2日間行ったトルイジンブルー染色画像で、図5は静置培養3日間行ったトルイジンブルー染色画像である。循環培養したもの、静置培養しか行わなかったもの、共に Scaffold 表面が HUVEC により、しっかりと覆われていることが分かる。また、図6、7は Calcein-AM と PI (Propidium Iodide) で生細胞と死細胞を同時に染色した画像で、図6は静置培養1日間、循環培養2日間行ったもの、図7は静置培養3日間行ったものである。図6と図7を比較すると、循環培養2日間行ったものは若干ではあるが、静置培養よりも HUVEC が伸展しているように見える。これは培地を循環させることにより生じた流れにより細胞に剪断応力がかかり、HUVEC が伸展したと考えられる。今後、長期間の培養を行い、剪断応力による内皮細胞の形態変化等についてさらに検討を進めていくことを考えている。

4 結論

超高静水圧印加処理と洗浄液による洗浄で脱細胞化した scaffold に HUVEC を播種・培養することができた。さらに循環型バイオリアクターを用いて、HUVEC に剪断応力を与えながら2日間培養すると、HUVEC に伸展が見られた。

Figure 3. The inner surface of acellular aorta after static culture.

Figure 4. The inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.

Figure 5. The inner surface of acellular aorta after 3days static culture.

Figure 6. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 2days circulation culture.

Figure 7. Confocal laser scanning microscopy of the inner surface of acellular aorta after 3days static culture.