20920 エレクトロスピンによる再生血管担体の作製 The fabrication of electrospun scaffold for tissue engineering

赤股 賢二郎, 正 古川 克子, 正 牛田 多加志

Kenjiro AKAMATA, Katsuko FURUKAWA, Takashi USHIDA
The University of Tokyo, Hongo7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo

Electrospun scaffolds get a lot of attention as useful tools for tissue engineering. To mimic the nonlinear elastic property as the blood vessel, we combined two polymers, PL-CL: poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) that has high elasticity and good biocompatibility and PL-LA: poly (L-lactic acid) that has high porosity and rigidity. However, PLCL scaffolds suffer from a low cellular infiltration rate, likely due in part to their low porosity and dense fiber packing. To increase their porosity, PL-CL and PEO: poly (ethylene oxide) (a water-soluble polymer) were co-electrospun from one spinneret to form dual-polymer composite scaffolds. With removal of The PEO component, these PL-CL scaffolds got the porosity that was about 30% higher than normal PL-CL scaffolds. When seeded with mesenchymal stem cells (MSCs), MSCs were observed only in the cross-section of the high porosity PL-CL scaffold. The combination of the high porosity PL-CL and PL-LA will result in the ideal scaffolds for tissue engineering.

Key Words :Electrospin, Scaffold, Tissue engineering

1. 緒言

近年, 再生医療において組織再構築型の再生血管が注目されている。再生血管において, 細胞の足場となる担体には, 生分解性・破断強度・多孔性・抗血栓性などが求められる。本研究では, 細胞の三次元的な増殖に適したナノファイバー構造を容易に作製可能なエレクトロスピン技術を用いて, 生分解性ポリマーを紡糸し, 多孔質担体を作製する[1]。また, 血栓形成の主原因は, 生体血管と人工血管間におこるコンプライアンスミスマッチ(弾性不適合)であり, 高い抗血栓性を実現するためには, 担体の弾性を生体血管に近づけることが非常に重要である[2]。生体血管はJカーブと呼ばれる非線形弾性特性を持っており, 担体においてこの弾性特性を再現することが必要である。よって本研究では, 非線形弾性を有する担体の作製を目的とする。具体的には, 力学特性の違う二種類のポリマーをスピンすることによって, 二層構造の複合担体を作製した。また, 一層目の高弾性ポリマーの気孔率を上昇させることで細胞導入の改善をはかった。エレクトロスピン装置概要を Fig.1 に示す。本研究においては, ターゲット距離15cm, 印加電圧12.5kVで統一して実験をおこなった。

Fig.1 Schematic depicting of the electrospinning device

2. 複合担体作製

二層構造の複合担体作製手順を Fig.2 に示す。まず, 高弾性の PLCL:poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)を一層目として紡糸し, 中のターゲットを外す。次に, より径の大きいターゲットを挿入することで歪みを負荷し, その外側に二層目として高破断強度の PL-LA: poly(L-lactic acid)を紡糸する。中のターゲットを外して歪みを取り除くことで, 複合担体を作製した。PLCLおよびPLLAの濃度はそれぞれ6[w/w%], 5[w/w%], スピン時間は30分である。

Fig.2 Double-layer scaffolds process

3. 内圧負荷実験

Fig.3に PLCL 担体, 複合担体(歪み無し), 複合担体(歪みあり)それぞれの内圧負荷実験の結果を示す。歪み無しで作製した複合担体は主に PLLA の弾性特性を表している。この結果から, 歪みを負荷して作製した複合担体は, 低圧力下においては, PLCL に近い性質, 高圧力下においては PLLA に近い性質を持つことがわかった。よって, 作製した複合担体は非線形の弾性特性を再現できていると言える。

Fig.3 Relative diameter-pressure curve

4. 高気孔率 PLCL 担体作製

細胞播種において、90%以上の高い気孔率を持つ PL-LA は細胞播種が容易であるのに対し、PL-CL は気孔率が約 50% と低いため、細胞がほとんど入っていないという問題がある。よって、水溶性ポリマーである PEO: poly ethylene oxide を PL-CL と同時にエレクトロスピンして担体を作製し、その後担体を水に浸して PEO のみを水溶させることで、気孔率の高い PL-CL 担体を作製する。エレクトロスピンによって作製した PL-CL および PEO 不織布表面の SEM 画像を Fig.4 に示す。SEM 画像より、PL-CL の繊維径は 500nm~1 μ m, PEO の繊維径は 5~10 μ m であった。細胞の大きさは約 10 μ m であることから、PEO を水溶させることで細胞が入る空間を確保することは可能と考えられる。

PL-CL および PL-CL/PEO 混合物をクロロホルムに溶解させ、混合溶液をエレクトロスピンすることによって担体を作製した。ターゲット内径 6mm, PLCL 濃度 6[w/w%], PEO 濃度 5[w/w%] の条件において 30 分間スピンを行った。

Fig.4 SEM images of (a)PL-CL, (b)PEO

5. 気孔率測定

作製した PL-CL/PEO 担体を約 37°C の水に 24 時間浸し、PEO を水溶させた。得られた PLCL, PLCL(PS: Post Submerge) 担体を不織布状にして、面積・厚み・質量を測定し、気孔率を算出した。その結果、PL-CL 溶液のみで作製した不織布の気孔率は 52.6%, PL-CL/PEO 混合溶液から作製した PL-CL(PS) 不織布の気孔率は 86% であった。PEO を犠牲繊維として水溶させることにより、気孔率を約 30% 上昇させることに成功した。

6. 細胞播種

ヒト由来のコラーゲンと 2.0 $\times$ 10 cells/graft のマウス MSC 細胞懸濁液の混合液に担体を浸し、アスピレータで陰圧を引くことによって細胞を侵入させた。その後、約 20 分間インキュベートして、コラーゲンをゲル化させた。

細胞播種した担体断面において、Calcein-AM, PI によって染色した生細胞・死細胞を蛍光顕微鏡で観察した。それぞれの蛍光画像を Fig.5 に示す。その結果、PLCL 担体においては、生細胞・死細胞ともにほとんど確認できず、細胞が中まで入っていないことが確認された。PEO を水溶させた高気孔率の PLCL (PS) 担体においては、わずかながら担体の中まで入りこんでいる生細胞を確認した。

Fig.5 Fluorescence images of scaffold cross-section (Green: Calcein-AM, Red: PI)

7. 結言

- ・ エレクトロスピン技術を用いて、PLCL と PLLA を紡糸することにより、二層複合担体を作製し、生体血管の非線形弾性特性を再現した。
- ・ PLCL と PEO を同時にエレクトロスピンした担体の PEO のみを水溶させることで、高気孔率の PLCL 担体の作製に成功した。
- ・ 高気孔率の PLCL 担体に細胞播種を行い、担体内において生細胞を確認した。

PLCL と PEO の同時スピニングにおいて、作製条件の最適化を行うことによって、さらなる気孔率・細胞導入効率の向上が見込まれる。

8. 参考文献

- [1] Zheng-Ming Huang et al., A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, Composites Science and Technology 63: 2223-2253, 2003
- [2] Irina Surovtsova et al. Effects of compliance mismatch on blood flow in an artery with endovascular prosthesis, Biomechanics 2078-2086, 2005, 38