

繊維性 scaffold 内における毛細血管網構築に関する研究

Study on fabrication of capillary networks within a fibrous scaffold

○ 釜島 黎 (東京電機大) 幡多徳彦 (東京電機大) 野中一洋 (東京電機大) 野口展士 (東京電機大)
荒船龍彦 (東京電機大) 本間章彦 (東京電機大) 福井康裕 (東京電機大) 舟久保昭夫 (東京電機大)

Rei KAMASHIMA, TokyoDenki University Norihiko HATA, TokyoDenki University
Kazuhiro NONAKA, TokyoDenki University Hiroo NOGUCHI, TokyoDenki University
Tatsuhiko ARAFUNE, TokyoDenki University Akihiko HOMMA, TokyoDenki University
Yasuhiro FUKUI, TokyoDenki University Akio FUNAKUBO, TokyoDenki University

Abstract: The most of artificial organs has been constituted by artificial material. However, there are problems, like thrombus formation and inflammation happen by long-term service in artificial material. In order to improve the biocompatibility of an artificial organ. It is necessary to develop a hybrid artificial organ, which is construct 3D scaffold and capillary networks. In this study, the fabrication of capillary networks was considered. We inoculated with RCB1994:UV ♀ 2 cells at 1.0×10^5 cells/cm² into the acrylics plate with 3D scaffold, and it was cultured for 14 days. In results, seeding cells were mutated into tubular. The capillary length was increased with change over time. In conclusion, it was possible to quantify the growth of capillary networks.

Key Words: Artificial Organ, Fibrous Scaffold, Electro Spinning, Artificial Capillary, Capillary Network

1. 背景及び目的

現在, 臨床現場で広く用いられている人工肺は主にポリウレタン等の生体適合性が高いと言われる人工材料によって作製されているが, 長期的な使用によって血栓形成や炎症反応が起こる問題点がある⁽¹⁾. このような問題を解決するために 3 次元的な細胞の足場 (scaffold) を構築し, その scaffold 上での細胞培養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られる.

しかし, ハイブリッド型人工肺を開発するためには, 3 次元 scaffold 内部に培養されている細胞に効率よく栄養素を供給する手段が必要となる. そこで, 毛細血管網を scaffold 内に構築することでこの問題を解決できると考えられる.

先行研究において, エレクトロスピニング法により繊維性 scaffold を 3 次元的に構築し, その 3 次元 scaffold 内へ血管内皮細胞を播種, 培養することで毛細管が構築されることが確認されている. しかし, 培養に用いたプレートの形状が観察に適しておらず, 毛細管が血管組織であるかの詳細な検討を行うことが出来なかった. そのため, 本研究では培養プレートを新たに改良し, scaffold と組み合わせて毛細血管網の構築及び構築された血管の定量評価法の確立を行うことを目的とした.

2. 毛細血管網作製実験

2-1 エレクトロスピニング法

エレクトロスピニング法とは, 高分子溶液に高電圧をかけることで溶液を噴射し, 帯電したプレートに吹き付け scaffold を作製する方法の一つである. この方法によって作製された scaffold は繊維性であり, 非常に細い繊維径と, 非常に大きな表面積を持つのが特徴である. また, 長時間スピニングを行うことで人工血管の作製や 3 次元構造を有する scaffold を作製することが可能である. エレクトロスピニング法の概要を Fig.1 に示す.

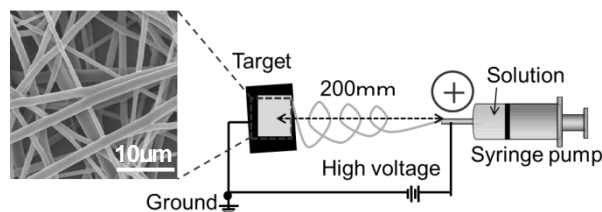


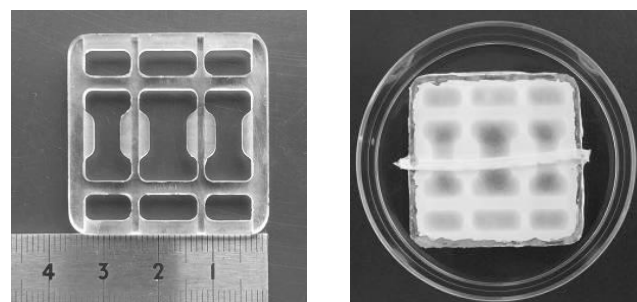
Fig.1 Diagram of electrospinning method

2-2 3次元構造 scaffold プレートでの培養実験方法

繊維性 scaffold を 3 次元的に構築し, かつ細胞培養及び観察を行うためアクリル板を加工し, 培養プレートを作製した. 作製したプレートを Fig.2 に示す. このプレートに scaffold を堆積させ, 小口径人工血管と組み合わせて 3 次元培養構造を構築した.

繊維性スキャフォールドおよび小口径人工血管は, セグメント化ポリウレタンを用いてエレクトロスピニング法にて作製した. 作製した培養プレートに 10 min 間スピニングを行い, 穴を開けた人工血管を設置した. 最後に人工血管を設置した培養プレートに 5 min 間スピニングを行い, 人工血管付きの 3 次元構造 scaffold を作製した.

作製した 3 次元構造 scaffold プレートにマウス由来血管内皮腫様細胞(RCB1994UV ♀2)を接種濃度 $X_0 = 1.0 \times 10^5$ cells/cm² で接種し, 14 日間の培養及び 3 日ごとの画像撮影を行った.



(a) Acrylics plate (b) Acrylics plate with scaffold

Fig.2 Cell culture plate

3. 実験結果及び考察

3-1 毛細管の位相差顕微鏡観察画像

位相差顕微鏡での観察結果を Fig.3 に示す。撮影画像より、培養開始から 14 日目までに、scaffold とは径の異なる物体が構築されていることが確認された。この物体を Fig.3 に矢印で示す。本実験のスピンニング条件で作製される scaffold の径は $2.0 \pm 1.0 \mu\text{m}$ である。画像より構築された物体の径は $10.0 \pm 5.0 \mu\text{m}$ であることから、scaffold とは異なる物体であることがわかる。また、この物体を拡大したものを Fig.4 に示す。Fig.4 の画像より、構築された物体の口部分が開いていることから管状になっていると考えられる。

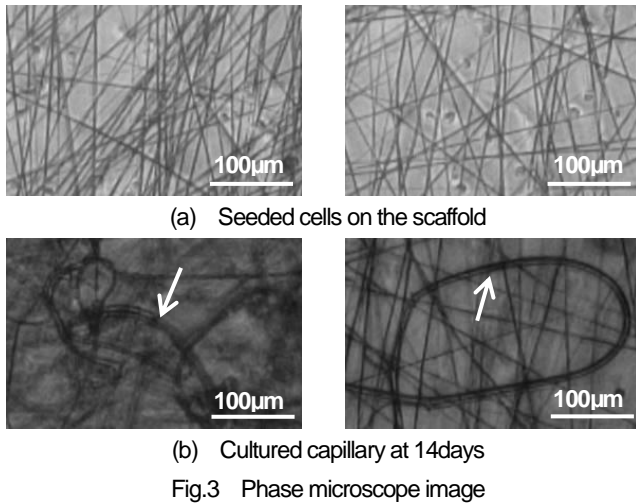


Fig.3 Phase microscope image

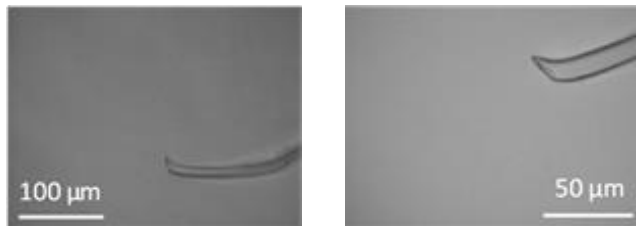


Fig.4 Enlargement of the capillary

3-2 毛細管の蛍光染色

撮影された画像より scaffold と径の異なる管状の物体が構築されたことが確認できた。これが細胞が形態を変化させたものであるかを確認するため、構築された物体に対して Calcein-AM 蛍光染色試薬 (タカラバイオ社) を用いて、蛍光顕微鏡の励起波長 500nm で観察を行った。その結果を Fig.5 に示す。

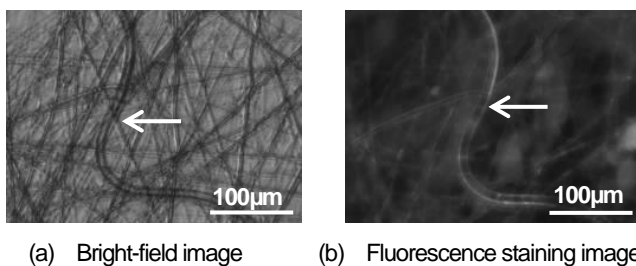


Fig.5 Fluorescence staining of capillary

この結果より、染色前の画像と染色後の画像を比較すると、矢印で示したように、染色後の画像において構築された物体の輪郭が見られることが確認された。Calcein-AM は細胞質にのみ反応し、蛍光させるため、scaffold は蛍光しない。そのため、構築された物体が細胞由来であると考えられる。このことから、本実験で構築され

た管状の物体は細胞が変化した毛細管組織(培養毛細管)であると示唆された。

3-3 培養毛細管の単位面積当たりの管長評価

構築された培養毛細管の評価を行うため、位相差顕微鏡で撮影した画像に対して NI vision assistant (National Instruments 社) を用いて $1715 \mu\text{m} \times 1286 \mu\text{m}$ の画像から 2 値化処理を施し培養毛細管を検出し、解析を行った。培養開始から培養毛細管の管長を計測し、管長に対する頻度分布の経時変化を Fig.6 に示す。

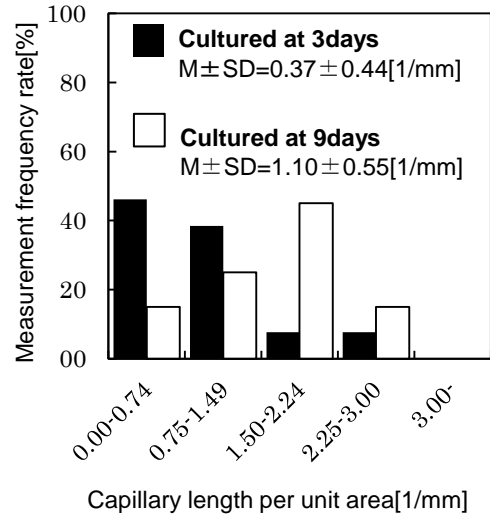


Fig.6 Frequency Distribution of capillary length per unit area

Fig.6 より、培養開始から 3 日目の単位面積あたりの管長は、 $1.50 [1/\text{mm}]$ 未満の範囲に多く分布していることが分かる。これに比べて 9 日目の場合、 $1.50-2.24 [1/\text{mm}]$ の範囲に多く分布していることから、培養日数の経過に伴って、毛細管が伸長していることが明らかとなった。このことから、培養毛細管を長期的に培養することで伸長させ、細胞へ効率よく栄養を供給する毛細管網として使用出来る可能性が示唆された。

4. 結言

本実験では繊維性 scaffold で作製した 3 次元 scaffold に血管内皮細胞を播種し、毛細管網の構築とその構築過程の定量評価法の確立を行った。その結果、毛細管長を指標とし評価することで、構築した培養毛細管の構築過程の定量評価が可能となった。

さらに、3 次元 scaffold 内に血管内皮細胞を播種することで細胞が形態を変化させ、細胞からなる培養毛細管を構築することが可能であると示唆された。

5. 謝辞

本研究の一部は平成 20~24 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (S0801023) の研究費、及び平成 21~23 年度独立行政法人科学技術振興機構の産学イノベーション加速事業【戦略的イノベーション創出推進】の研究費によって支援されました。

6. 参考文献

- (1) 川村慎一, 「人工肺」, 人工臓器 2013 ; 42 巻 3 号:p188-190