

第6章

血管新生における細胞播種の影響の検討

6.1 実験目的

本章では、開発した血管新生観察装置の応用例として、細胞播種の有無が血管新生速度に与える影響を検討した。予備実験において、皮下組織を1mm角程度の大きさにまで細切し、Scaffoldと一緒に体内に埋め込んだ系では、Scaffoldだけを埋め込んだ系に比べて血管や組織の新生速度が速く、血管径も太い傾向にあるという結果を得た^[59] (図6-1)。そこで、血管新生を促進させる要素を同定する基礎研究として、Scaffoldと共に細胞を播種することを考えた。予め皮下組織から単離培養した細胞を、血管新生観察装置を埋め込むときにScaffoldに播種し、Scaffoldにおける血管新生速度を、細胞を播種しない場合と比較検討した。

6.2 実験方法

図6-2に実験方法の概要図を示す。はじめに観察装置を埋め込む予定の生体から皮下組織を摘出し、初代培養を行い、*in vitro*で培養する。血管新生観察装置を2つ用意し、一方にはScaffoldのみを埋め込み、他方にはScaffoldと培養した皮下細胞と一緒に埋め込み、Scaffoldに新生する血管の観察を行う。新生した面積を割り出し、血管新生速度を算出し比較を行う。

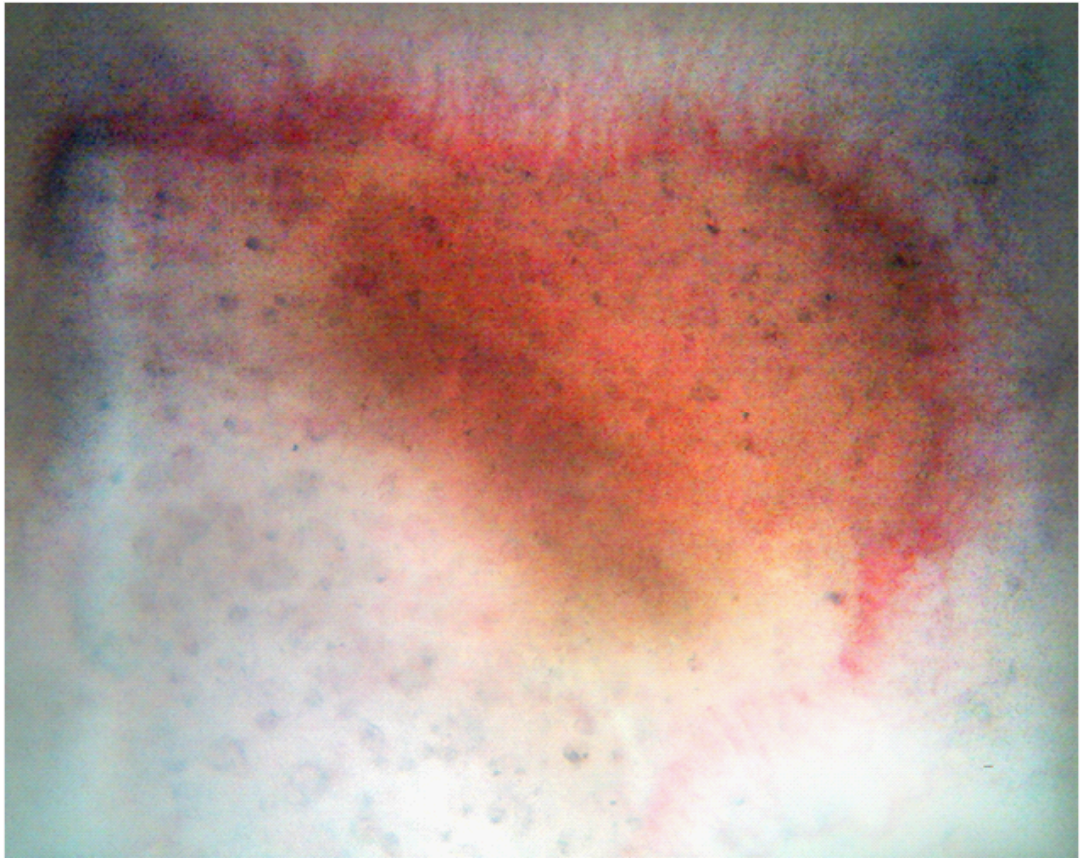


図 6-1 組織播種による血管新生の変化
(上 : Scaffold のみ 下 : Scaffold + 皮下組織)

- 実験方法概要 -

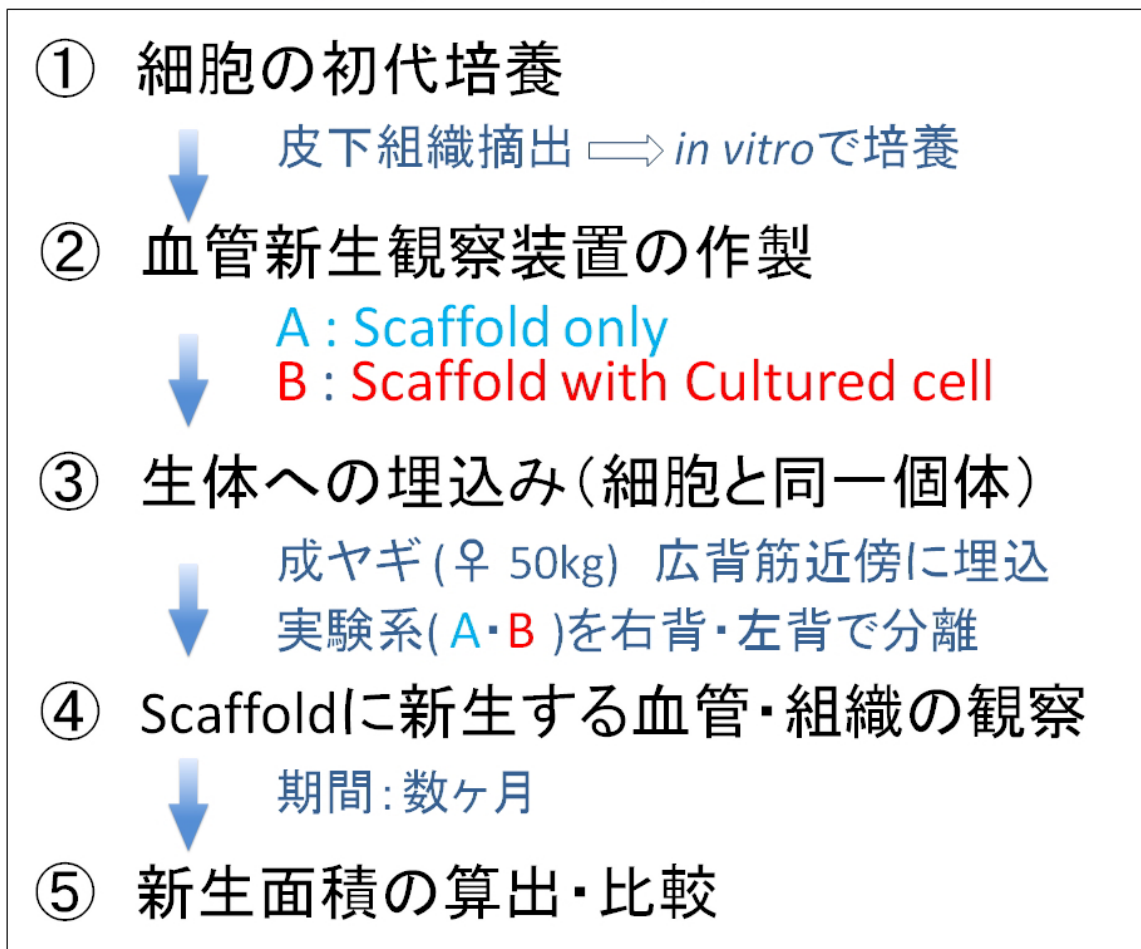


図 6-2 実験方法の概要

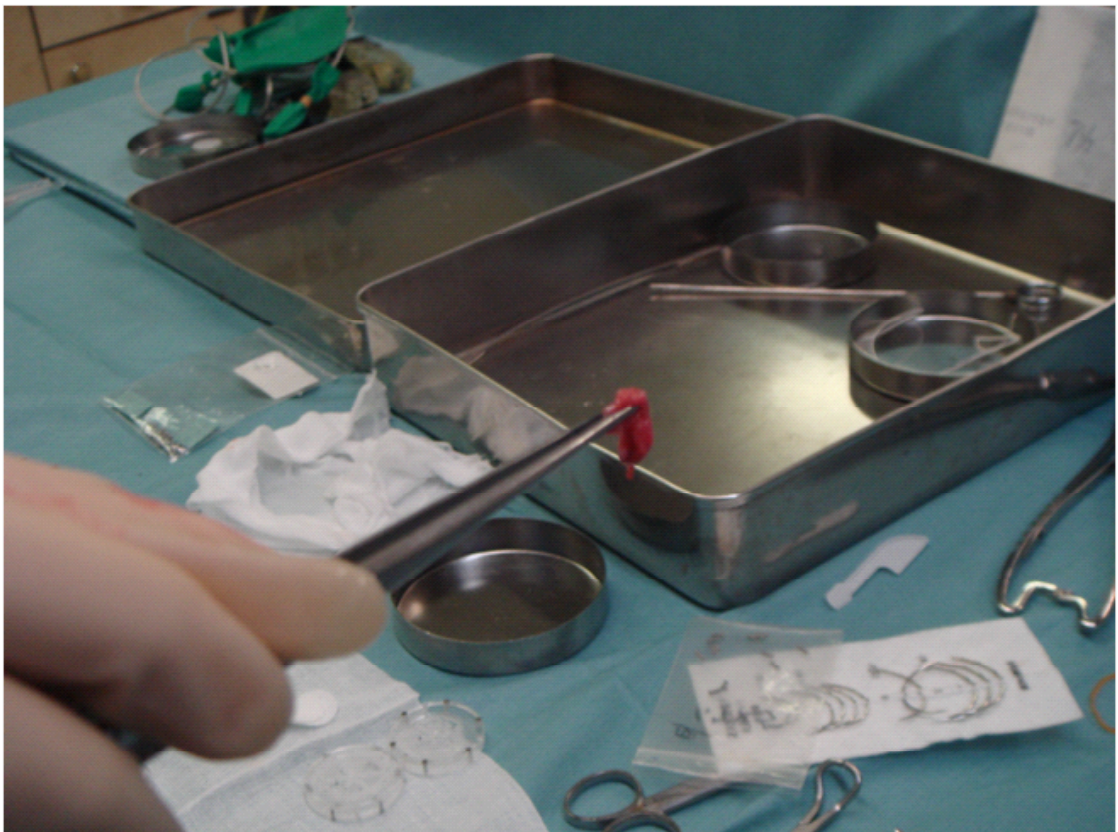
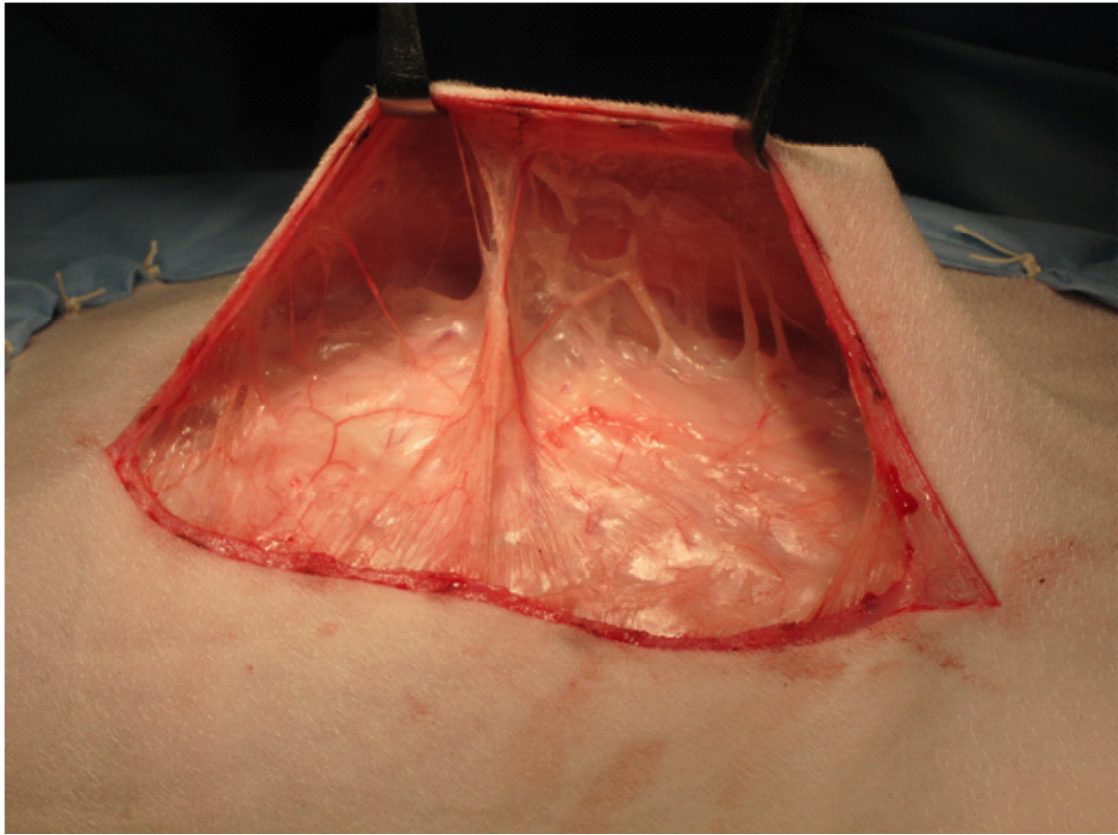


図 6-3 皮下組織摘出の様子
(上：肋骨付近の皮下 下：摘出した皮下組織)

6.2.1 播種細胞の初代培養方法

初代培養の方法は参考文献にならって、一般的な方法を用いた^[60-63]。血管新生観察装置を埋込予定の動物（成獣ヤギ、45-48kg、♀）から、麻酔下で皮下組織から5mm角程度の組織片を5個摘出した（図6-3）。クリーンベンチ内においてはさみを用いて可能な限り小片化した後、タンパク分解酵素（トリプシン/EDTA、クラボウ、大阪）を用いて組織から細胞を単離した。単離の際は振とう恒温槽（Personal-11、タイテック、埼玉）を用いて、37度の温水中で20分加振し、タンパク分解酵素の触媒効果を高めた。その後、タンパク分解酵素を無効化し、遠心分離（KR/702、KUBOTA、東京）して単離された細胞を取り出した。シャーレに単離された細胞を培養液と共に播種し、37度、5%CO₂に設定したインキュベーター（BNA-111、ESPEC、大阪）中で培養した。播種後1週間経過の後、コンフルエントまで増殖したところで継代し、必要な細胞数になるまで培養を続けた。摘出から培養まで全て無菌操作下で行った（図6-4）。

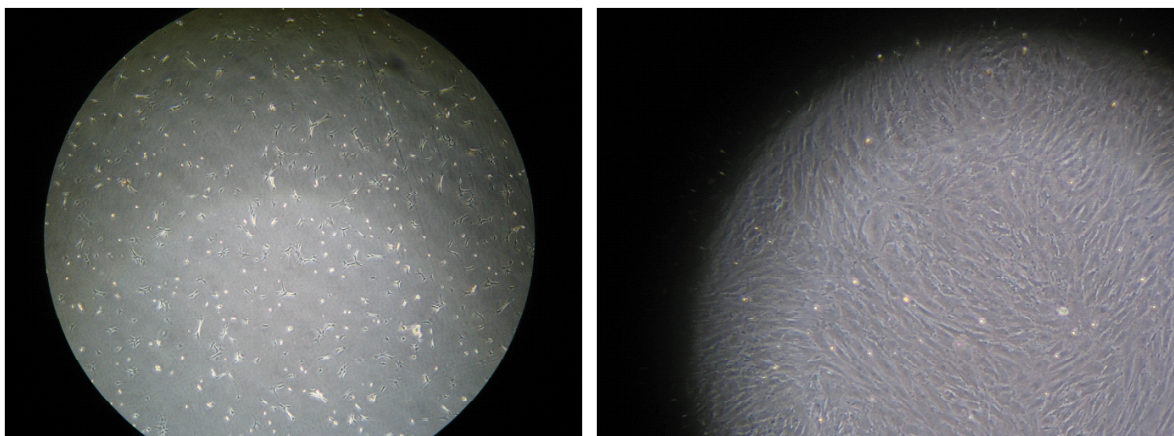


図6-4 細胞の初代培養
(左：単離細胞播種（1日後） / 右：コンフルエント状態)

6.2.2 細胞播種比較実験方法

細胞の有無が血管新生速度に与える影響を調査するために、2組の血管新生観察装置を用意し、Aの実験系では Scaffold のみの埋め込みを用い、Bの系では Scaffold に培養細胞を播種し、生体に埋め込みを行った。Scaffold に新生する血管を毎時記録し、その画像から新生した面積を算出する。画面内の新生面積率から血管新生速度を算出した。図 6-2 に実験方法の概要図を示す。免疫反応による影響を除去するために、皮下組織を摘出した生体と、観察装置を埋め込む動物は同一個体を使用した。実験は2頭の成獣ヤギを用いて4例の実験を行った。

6.2.3 動物実験方法

3.3.2 項と同様な実験方法で、長期動物実験用チャンバー型血管新生観察装置 (Type III) を、2頭の成獣ヤギ (45kg と 48kg、メス、ザーネン種) の皮下の肋骨上広背筋近傍に埋め込んだ (図 6-5)。比較のために実験系 A は左側面に、B は右側面に埋め込みを行った (図 6-6)。Scaffold はどちらの系でも第3章で選定した PGA Scaffold を用い、サイズ $10 \times 20 \times 0.3\text{mm}$ とした。播種細胞は埋込直前に細胞懸濁液を Scaffold に含浸させた。その時の細胞数は $1 \times 10^7 / \text{cm}^3$ とした。手術後は皮膚貫通ケーブル部からの感染に注意し、飼育ケージにおいて清潔な状態で管理した。

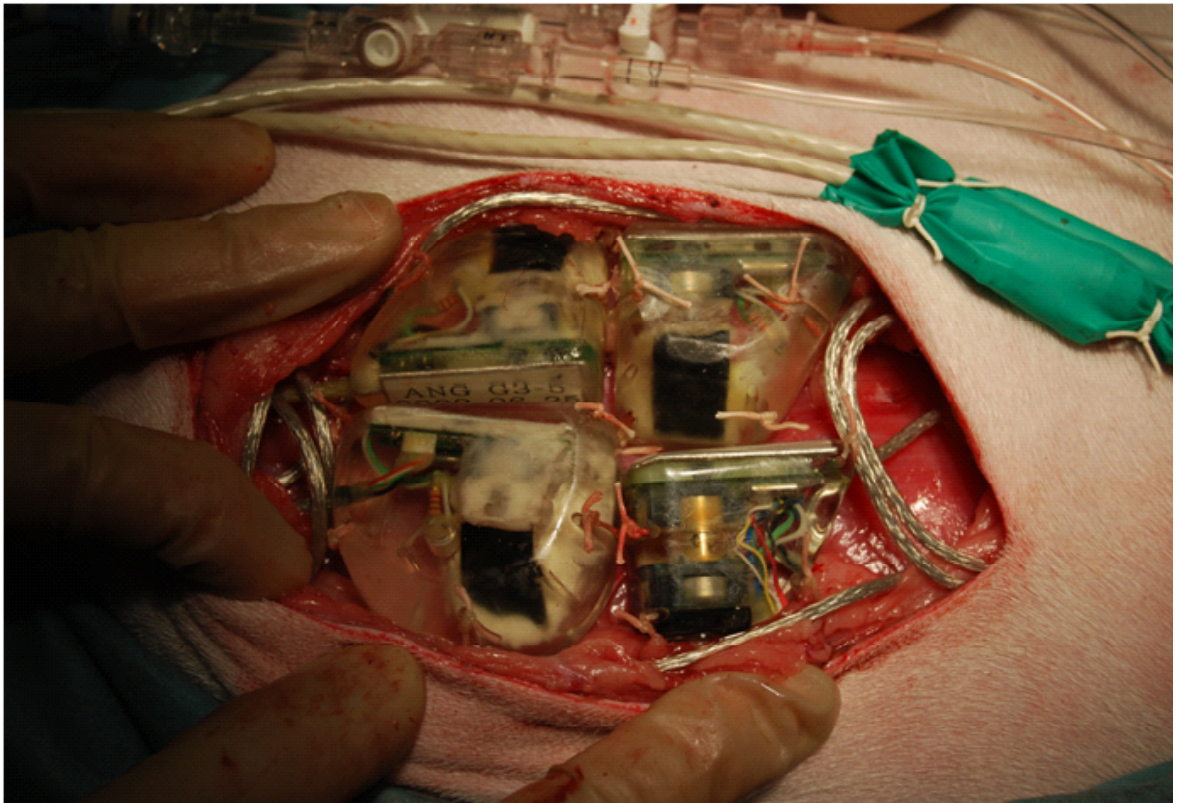


図 6-5 埋込時の様子



図 6-6 観察装置埋込後時の様子
(上：左側 下：右側)

6.2.4 血管新生の観察方法

観察装置 1 台に対してモニター PC を 1 台用意し、USB インターフェースを用いて接続し、制御および撮影を行った。モニター PC は専用開発したプログラムによって観察装置を自動的に制御し、1 時間に 1 枚の間隔で静止画を撮影した。画像撮影設定は明るさ、ホワイトバランス、コントラストを固定して撮影した。撮影ごとにオートフォーカスを機能させ、画像中心の焦点が自動的に一致するようにプログラムで制御した。画像解像度は 1280×1024 pixel で、無圧縮のビットマップ形式で保存した。

6.2.5 血管新生速度の算出方法

取得した画像から新生面積を算出し、10 日ごとの新生面積の変化を新生速度とした。取得画像から画像処理解析ソフト（Photoshop CS3、アドビシステムズ、東京）を用いて、面積を算出した（図 6-7）。境界領域の選択は手動で行い、3 回の平均値を用いた。

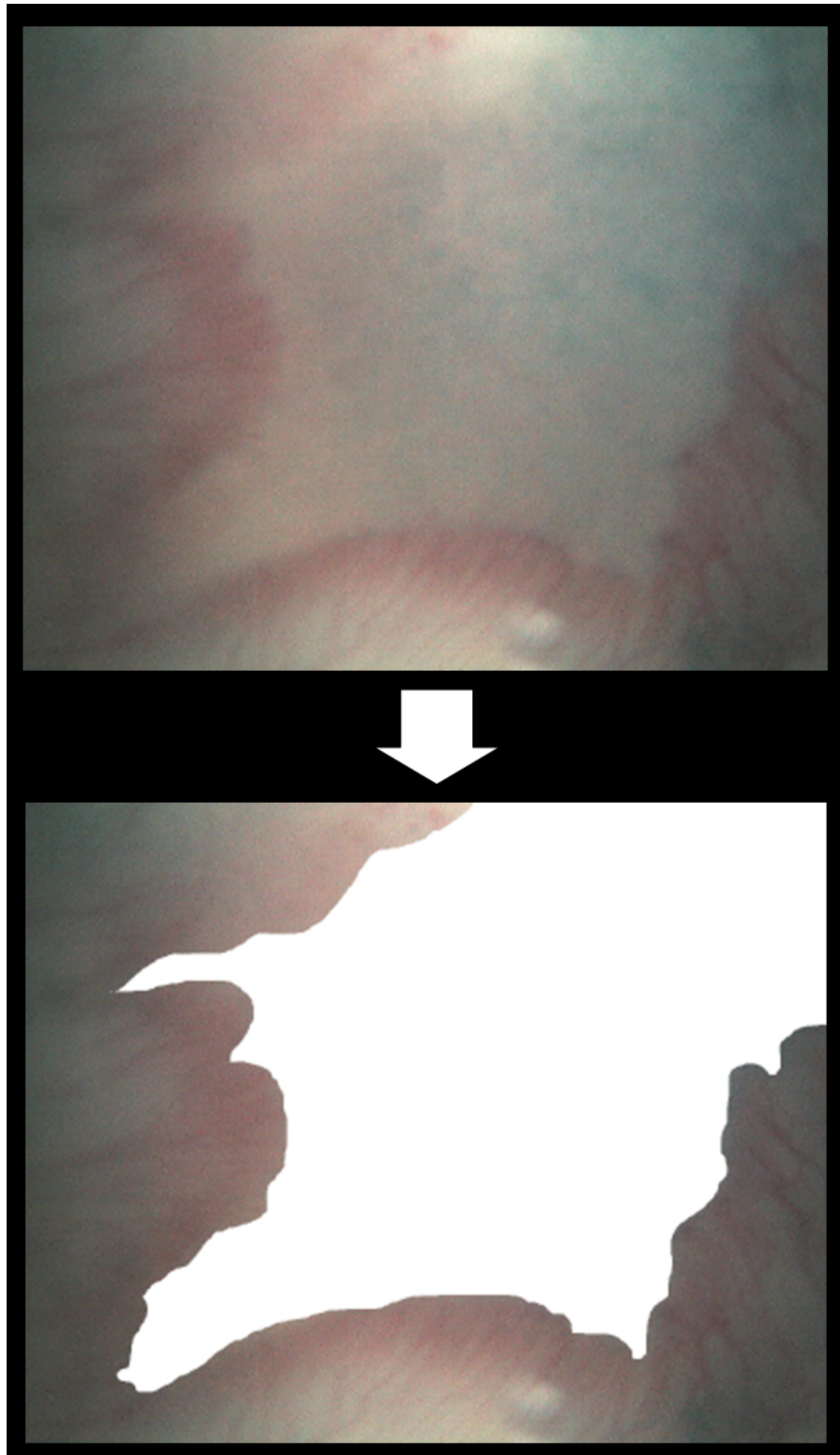


図 6-7 新生面積の算出方法例

6.3 実験結果

図 6-8 および 5-9 に比較実験の画像結果を示す。青線で囲んだ画像群は Scaffold のみを用いた実験系 A で、赤線で囲んだ画像群は Scaffold に細胞を播種した実験系 B の結果である。埋め込み直後の第 0 週ではどちらも青い繊維状の Scaffold のみが観察された。細胞播種系の B の画像には細胞を観察することはできなかった。3 週目から A、B 両系で画面左から血管が新生し始める様子が観察された。5 週目に A ではわずかに血管が伸長した。B では、左からの新生が大きく成長し、下面と右面からも新生が見られた。どちらの系でも新生部の先端では細い毛細血管が多く見られた。6 週目で A では下面からの新生が確認され、左面からの新生も伸長した。B では各面からの新生は大きく伸長し、上面からの新生も見られた。7 週目の B では新生の先端では多くの毛細血管が見られるが、新生が終了した部位では、毛細血管は減少し、選択的に太い血管が残る様子が観察された。また太い血管から分岐される多くの血管が観察された。各面からの新生は結合し、いくつかの血管が残る様子が観察された。9 週目に B ではほぼ血管組織新生が終了し、画面右上にわずかに Scaffold を確認できる程度まで新生した。その時、A では全体の 4 割程度の面積が Scaffold で、新生速度に違いがあった。これらの実験を 2 頭の動物を用いて 4 例おこなった時の結果を図 6-10 に示す。横軸に埋込日数、縦軸を新生面積率にとった。図の寒色系（青、水色、紫、緑）で示したプロットが実験系 A の Scaffold のみを組み込んで実験を行った結果で、暖色系（赤、橙、桃、黄色）で示したプロットが Scaffold に細胞を播種した実験結果である。2 頭の動

物を用いてそれぞれ2例行い、動物の個体を実線と破線であらあわした。A、B両系ともほぼ同時に3週目から血管新生を確認でき、その時期の両系には大きな差は見られなかったが、5週目から差が開きはじめ、6週目以降は大きく差が開いた。その結果、Scaffoldに細胞を播種した系では、Scaffoldのみの系に比べ、早く血管が新生するという結果を得た。

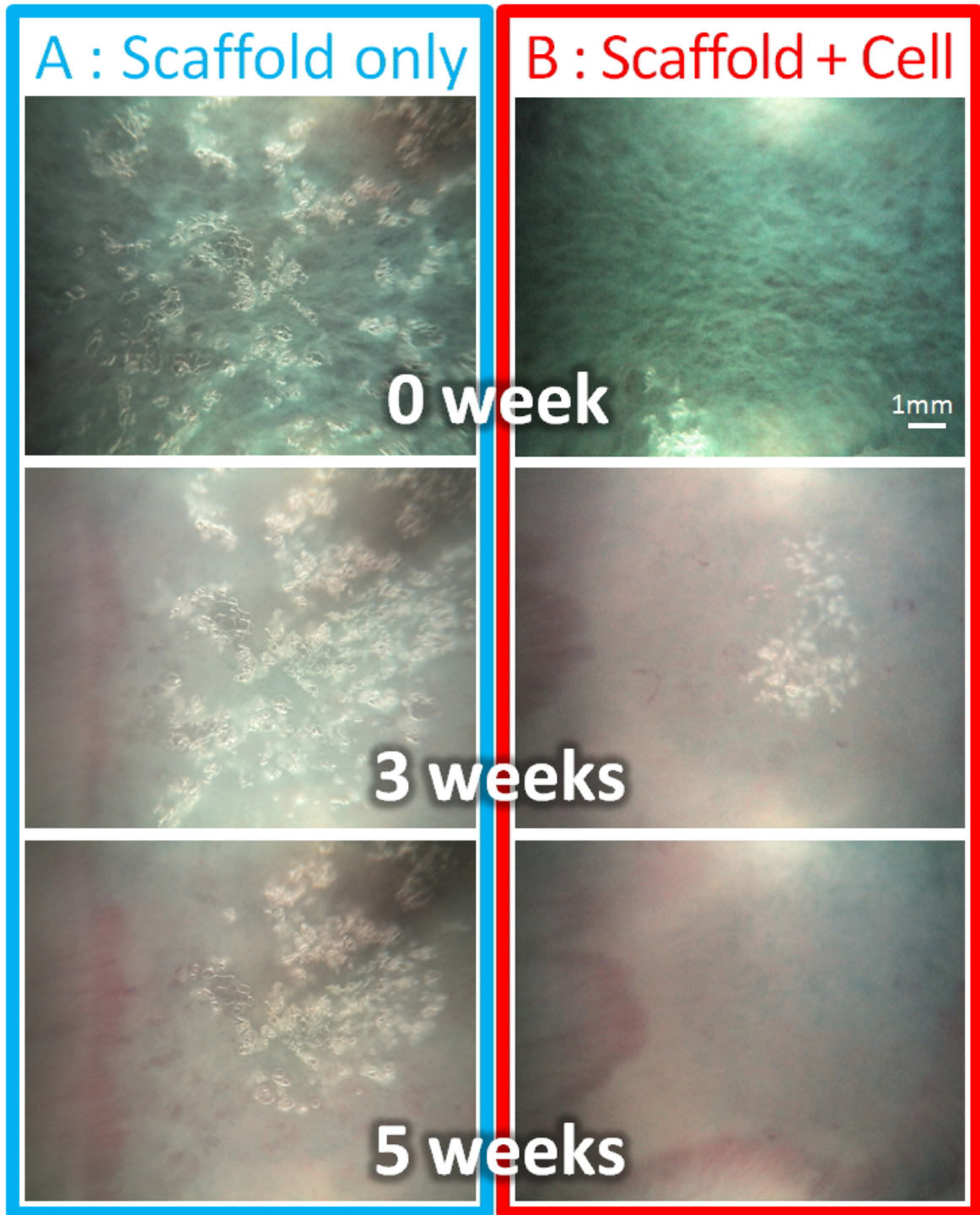


図 6-8 細胞播種比較結果 (0 ~ 5 週)

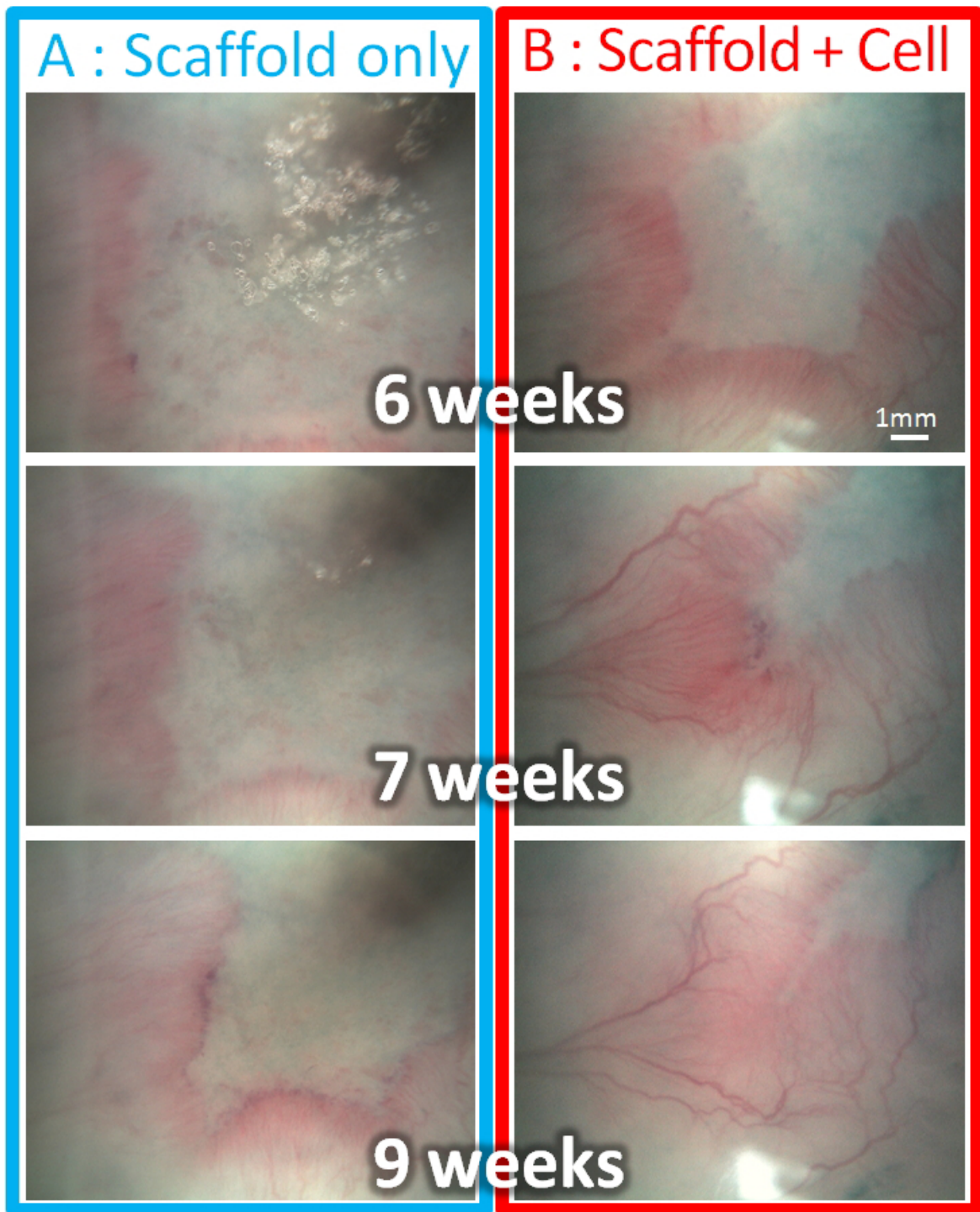


図 6-9 細胞播種比較画像 (6 ~ 9 週)

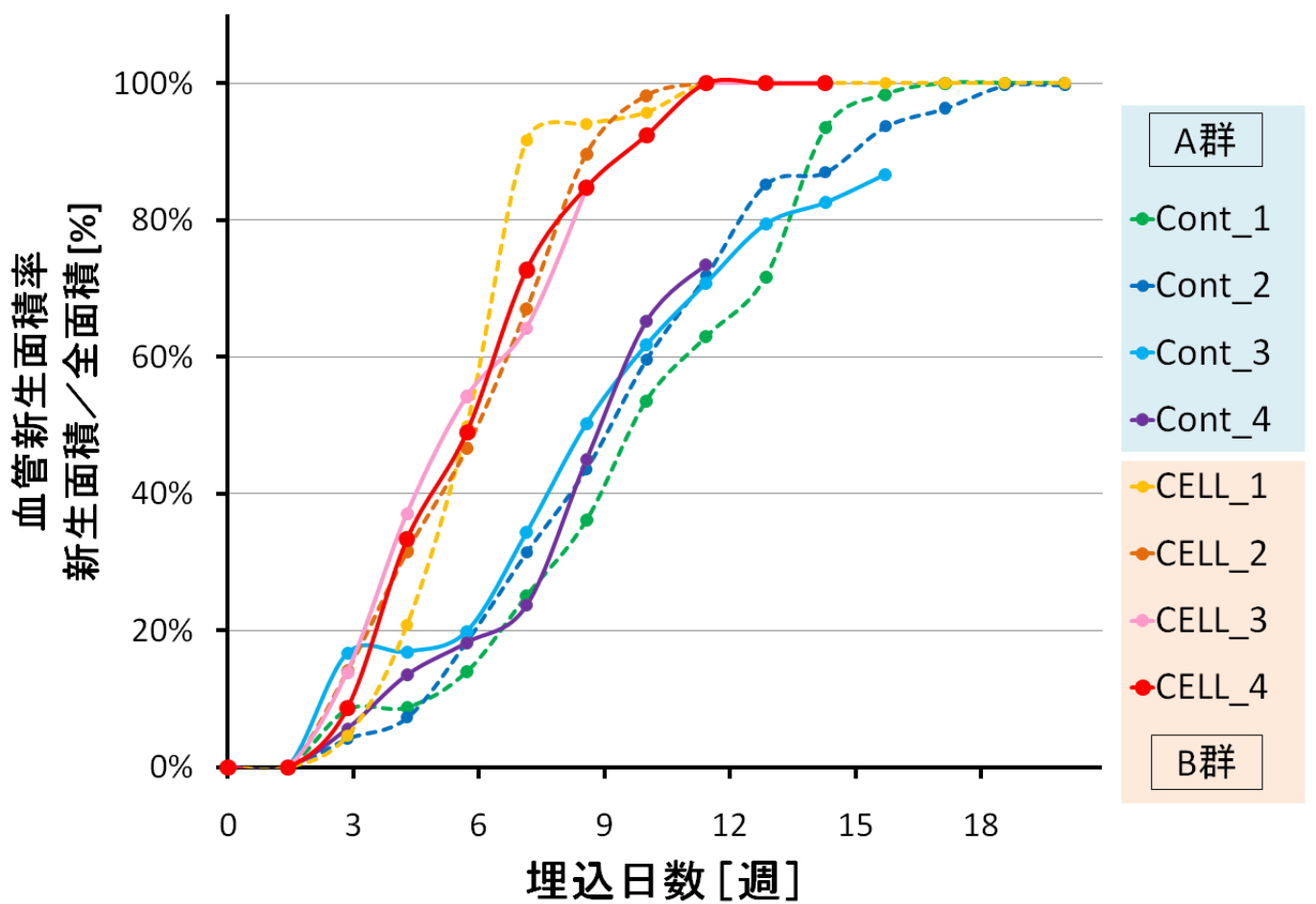


図 6-10 細胞播種比較実験結果（4例の結果）

6.4 考察

本研究で開発した、低侵襲で、麻酔等を用いることなく血管新生を長期間安定して観察可能な血管新生観察装置を用いて、培養した細胞の有無が血管新生に与える影響の検証を行った。細胞播種以外の条件を統一した上で、画面内の新生面積率を比較したところ、Scaffold のみに比べて Scaffold に培養細胞を播種した系では早く血管が新生した。これは予備実験として組織を播種した時と同様の結果であった。図 6-10 のグラフの細胞を播種した A 系と Scaffold のみの B 系では、6 週目以降はほぼ相似する曲線を描いている。6 週目までの初期段階に播種した細胞の影響が強く表れていると考えられるが、細胞の有無が血管新生に与える速度差の機序は今後の検討事項であるが、皮下細胞中の線維芽細胞の影響や、血管内皮細胞の増殖因子 (VEGF 等)、培養細胞からのサイトカインなどの影響が考えられる。今後これらについて検証する必要があると考えられる。本試験では、培養細胞の有無が血管新生に与える影響を検討するために、その対照実験として、細胞非播種の Scaffold を用いたが、本実験を受けてさらに精査するために、摘出した細胞の中から、線維芽細胞や血管内皮細胞など種類を特定・単離した上で播種する事で、ある特定の細胞が血管新生に与える影響を検討可能になると考えられる。培養した細胞を播種してから、画面内に血管組織が新生し観察可能になるまで約 3 週間を要している。この 3 週間の間、播種した培養細胞が Scaffold 中で生存しているかは明かではないが、播種細胞が生存していても、死滅していても、その細胞が播種されることで血管新生に何らかの影響を与えていると、本実験か

ら類推される。今後、細胞の何が新生に影響を与えているかを検討する1つの材料として、播種細胞が3週間の間生きているか死んでいるかを評価するか、予め体外で死滅した細胞と生きた細胞を Scaffold に播種して比較することであると考えられる。

第5章の動物実験結果と第6章の非播種の結果を比べると、視野の全面に血管・組織が覆われるまでの日数が異なっているが、これは、これまでに作製した12個の Type III 観察装置のうち6個は試行錯誤しながら条件を定めたもので、その後新生速度比較用として、観察装置のサイズ・規格と Scaffold のサイズを統一して第6章の実験を行った。第5章と第6章では詳細な実験条件が異なるため、第5章と第6章の非播種では時間差のある結果が得られたと考えられる。

今回は新生した血管および組織の面積を算出し、新生速度のみを評価したが、新生血管だけを評価するためには、取得画像から血管を選択的に抽出し、その走行と径を算出することで評価することが可能であると考えられる。そのためには、コンピュータを用いた画像処理が不可欠になるが、今回得られた画像では、血管と組織の境界のコントラストが低く、血管のみの抽出は困難であった。この課題に関しては、より高解像度の受像素子を用いるか、光学倍率を大きく変更することで対応することが可能ではあるが、同時に背反条件であるデバイスサイズと、視野の問題が生じるため、現状では容易には解決できない課題である。

第7章

総合考察

Scaffoldに新生する血管を長期間安定に観察するためには、血管新生観察装置の開発が重要な課題であった。方法としては、イメージ素子を用いたワンピースの血管新生観察装置を開発し、それにScaffoldを内蔵することにした。この方法を用いると、Scaffoldが血管新生観察装置にうまく固定されるため、画像がぶれるのを防止できると考えたためである。

まず、血管新生観察装置に内蔵するScaffoldの適切な厚さを検討した。Scaffoldが厚いと血管がScaffold中に潜り込んでしまうため視野に入る血管が少なくなる可能性があり、逆にScaffoldが薄いと、血管や組織が誘導されない可能性があったからである。実験からは、厚さ0.3mmであれば、血管や組織の新生もよく、また新生血管の画像もうまく観察できることがわかった。

この結果を受けて、血管新生観察装置の開発に取りかかった。本研究では、3種類(Type I、Type IIおよびType III)の血管新生観察装置を開発した。Type Iは、CCDプローブユニット、Scaffold、光源ユニットから構成した。動物実験の結果、Scaffold中に血管や組織が新生する様子を観察することができたが、画像は不鮮明で、血管新生を観察するにあたって満足できる画質ではなかった。また、血管新生が誘導されるまでに要する時間が長かったという問題点もあった。

Type IIは、Type Iをもとにして改良したものである。Type IIでは、血管新生が

誘導されるまでに要する時間が長いという問題点は解決できたが、撮影画像の画質については、Type I と同様に、組織の新生により Scaffold が加水分解され始めると焦点深度が変化し、血管画像はコントラストの低い画像しか得られず、さらなる改善が必要であった。

なお、Type I の CCD ユニットでは、血管新生観察装置からの受像信号をアナログ信号で伝送し、外部のモニター PC でデジタル化する手法をとっていたが、Type II では、血管新生観察装置の中でアナログ信号をデジタル化し、以後の伝送系では全てデジタル信号のままで処理したため伝送中のノイズ混入や、デジタル信号変換時のノイズなどが生じなかったのは画像の安定化に有効であった。

Type III では、基本的なコンセプトは Type II を踏襲し、主に画質に関する問題の改善を図った。高解像度の CMOS 素子を使用し、オートフォーカス機能を実装したことで、これまでよりも鮮明な画像を得られた。また Type II の観察装置で生じた光源の問題も改善され、ハレーションが写り込むこともなくなった。その結果、より詳細な血管新生の経時的な変化を観察することが可能となった。デバイスサイズも $37.4 \times 42.3 \times 19.7$ mm と、これまで作製した血管新生観察装置の中で最も小型になり、生体へ与える影響を小さくできた。外部コンピュータと接続することによって最大 1280×1024 画素 (SVGA) の解像度で画像を静止画および動画を出力でき、動画では最大 30fps で記録することが可能になった。観察可能な視野範囲は 11.9×9.6 mm で、これは 1 画素あたり $9.3 \mu\text{m}$ の大きさを表しており、視野の広さと解像度の両者を改善できた。

血管新生の長期連続観察実験は、完成度の高い Type III の血管新生観察装置を用いて行った。観察結果では、新生組織の先端部は毛細血管が多く見られ、血管や組織の新生が終了した部位では、毛細血管は減少し、Scaffold が消失し、太い血管だけが残る様子を観察することができた。血管新生観察装置の耐久性としては、最長で 355 日間画像を安定して取得することができ、ほぼ 1 年は使用できる可能性を得た。これらの結果より、開発した血管新生観察装置を用いれば、麻酔や沈静薬剤を必要とせず、かつ厳しい拘束をすることなく長期間安定して、Scaffold における血管新生を連続観察できることを実証できた。

また、動物実験では、抗生物質や抗菌剤は投与していなかったが、心配された感染は起こらなかった。感染に関しては、皮膚を貫通するケーブルがあると高率に感染が起こることが報告されているため^[64-66]、今後は血管新生観察装置を体内完全埋込式とし、体外から体内へワイヤレスで通信や電力伝送を行うシステムを研究開発することを検討している。

本論文では血管新生観察装置を用いた研究の応用として、細胞播種が Scaffold における血管新生に与える影響について検討した。その結果、Scaffold に細胞を播種した系では、Scaffold のみの系に比べ、早く血管が新生するという結果を得た。これにより、細胞の有無が血管新生の速度に影響をおよぼすことが明らかになったが、その機序は明らかにはなっておらず、今後の課題である。

本研究では、単一の Scaffold を使用したが、Scaffold の材質や構造を変更することで、Scaffold の評価をすることも可能となると考えられる。また、薬剤の

徐放機能を持つ Scaffold や、薬剤の持続導入管を用いて、その薬剤の作用を評価することも可能であると考えられる。さらには、毛細血管内の血流を確認できるまで倍率あげることで、人工心臓の駆動方式の違いを評価することも可能となると考えられる。以上のように、本研究で開発した血管新生開発装置は、血管新生における細胞播種の影響以外にも様々な研究に応用可能であり、その有用性が期待できると考えられる。

第8章

結語

組織工学材料としての Scaffold に新生する血管を長期間安定に観察するために、3種類 (Type I、Type II および Type III) の血管新生観察装置を開発した。最初の2機種 (Type I および Type II) では、解像度が低いことと、組織の新生により Scaffold が加水分解され始めると焦点深度が変化してコントラストが低下することにより、鮮明な画像が得られなかった。Type III では、高解像度 CMOS 受像素子とオートフォーカス機能を備えることにより画質の問題を解決した。血管新生の長期連続観察実験は、Type III の血管新生観察装置を用いて行った。その結果、開発した血管新生観察装置を用いることで、麻酔や沈静薬剤を必要とせず、かつ厳しい拘束をすることなく長期間安定して、Scaffold における血管新生を連続観察できることを実証した。血管新生観察装置の耐久性としては、最長で 355 日間画像を安定して取得することができた。開発した血管新生観察装置の応用研究として、細胞播種が Scaffold における血管新生に与える影響について検討した。その結果、細胞を播種した方が細胞を播種しない場合よりも Scaffold における血管新生の速度が早いことを明らかにした。本観察装置は、様々な研究に応用可能であり、その有用性が期待できると考えられる。これらの事から、本研究で目的とした長期間安定して血管新生を観察可能な観察装置を開発した。

謝辞

本研究にあたり、御指導、御助言、御鞭撻を賜りました東京大学医学系研究科阿部裕輔准教授、井街宏名誉教授に心より御礼申し上げます。また研究当初より本研究にご理解を頂き、細部まで御討論、御援助頂きました東京大学大学院医学系研究科 斎藤逸郎先生、中川英元先生、磯山隆講師に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、動物実験に献身的にご協力、ご援助頂きました小野俊哉技術職員、高森治子 秘書、河野明正 元技術職員、時偉、石井耕平、高森ひとみ、岸亜由美、光宗倫彦、光宗礼佳、山口さち子、中野英美子、諸氏に深く感謝いたします。また、折に触れ御助言、御高説を賜った東海大学の三田村好矩教授、藤田裕明教授、岡本英治教授、北海道大学の村林俊准教授、西村生哉先生に感謝いたします。最後に、私の志を理解して、長きにわたり多大なる援助と勉学の機会を与えてくれた両親 井上和晴・京子と祖父 雅夫に深く感謝いたします。

引用文献

- [1] He XC, Yin T, Grindley JC, Tian Q, Sato T, Tao WA, Dirisina R, Porter-Westpfahl KS, Hembree M, Johnson T, Wiedemann LM, Barrett TA, Hood L, Wu H, Li L. PTEN-deficient intestinal stem cells initiate intestinal polyposis. *Nat Genet.* 39(2):189-98. 2007
- [2] Williams AH, Valdez G, Moresi V, Qi X, McAnally J, Elliott JL, Bassel-Duby R, Sanes JR, Olson EN. MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science.* 326(5959):1549-54. 2009
- [3] Basic D, Vacek I, Sun AM. Microencapsulation and transplantation of genetically engineered cells: a new approach to somatic gene therapy. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 24(3):219-55. 1996
- [4] Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg.* 194(4):413-28. 1981
- [5] Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, Mortisen DJ, Tulloch NL, Hauch KD, Torok-Storb B, Ratner BD, Pabon L, Murry CE. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: mplications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(1):80-9. 2010
- [6] Kane NM, Meloni M, Spencer HL, Craig MA, Strehl R, Milligan G, Houslay MD, Mountford JC, Emanuelli C, Baker AH. Derivation of endothelial cells from human embryonic stem cells by directed differentiation: analysis of microRNA and angiogenesis in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(7):1389-97. 2010
- [7] Baker SC, Rohman G, Southgate J, Cameron NR. The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. *Biomaterials.* 30(7):1321-8. 2009
- [8] Nolden L, Edenhofer F, Peitz M, Brüstle O. Stem cell engineering using transducible Cre recombinase. *Methods Mol Med.* 140:17-32. 2007

- [9] Sadelain M, Boulad F, Lisowski L, Moi P, Riviere I. Stem cell engineering for the treatment of severe hemoglobinopathies. *Curr Mol Med. Review.* 8(7):690-7. 2008
- [10] Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Lesot H. Crown formation during tooth development and tissue engineering. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 312B(5):399-407. 2009
- [11] Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil.* 36(5):368-89. 2009
- [12] Ulrich Meyer, Hans Peter Wiesmann, Jörg Handschel, Norbert R. Kübler. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Part V: Bone Tissue Engineering.* 211-32. 2009
- [13] Martins A, Chung S, Pedro AJ, Sousa RA, Marques AP, Reis RL, Neves NM. Hierarchical starch-based fibrous scaffold for bone tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med.* 3(1):37-42. 2009
- [14] Dai ZW, Zou XH, Chen GQ. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an injectable implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion. *Biomaterials.* 30(17):3075-83. 2009
- [15] You Q, Wang F, Duan L, Du X, Xiao M, Shen Z. Construction of small-caliber, polydioxanone cyclohexanone vascular stents. *Cell Biochem Biophys.* 57(1):35-43. 2010
- [16] Schussler O, Chachques JC, Mesana TG, Suuronen EJ, Lecarpentier Y, Ruel M. 3-dimensional structures to enhance cell therapy and engineer contractile tissue. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 18(2):188-98. 2010
- [17] Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol. Review.* 33(1):27-34. 2005
- [18] Schaefermeier PK, Szymanski D, Weiss F, Fu P, Lueth T, Schmitz C, Meiser BM, Reichart B, Sodian R. Design and fabrication of three-dimensional scaffolds for tissue engineering of human heart valves. *Eur Surg Res.* 42(1):49-53. 2009

- [19] Bradley R. Ringeisen, Barry J. Spargo and Peter K. Wu. Cell and Organ Printing Part VI.: N.E. Fedorovich, L. Moroni, J. Malda, J. Alblas, C.A. van Blitterswijk and W.J.A. Dhert. 3D-Fiber Deposition for Tissue Engineering and Organ Printing Applications.: 225-39. 2010
- [20] Zawicki DF, Jain RK, Schmid-Schoenbein GW, Chien S. Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc Res.* 21(1):27-47. 1981
- [21] Lokmic Z, Stillaert F, Morrison WA, Thompson EW, Mitchell GM. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J.* 21(2):511-22. 2007
- [22] Ezra-Cohn HE, Bullough PG, Trueta J. The growth of bone autografts in rabbit ear chambers. *J Bone Joint Surg Br.* 51(2):372-9. 1969
- [23] Sakakibara Y, Nishimura K, Tambara K, Yamamoto M, Lu F, Tabata Y, Komeda M. Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 124(1):50-6. 2002
- [24] Wagner G. Auto-transplantation of rabbit myometrium into ear-chamber and recording of its activity. *Acta Endocrinol (Copenh).* 79(4):767-77. 1975
- [25] Dedrick RL, Flessner MF. Pharmacokinetic problems in peritoneal drug administration: tissue penetration and surface exposure. *J Natl Cancer Inst. Review.* 89(7):480-7. 1997
- [26] Mourad, Faisal MRCS; Duncan, Andrew J. FRCS. Tissue Stabilizer Reverse Mounting in Minimally Invasive Direct Coronary Artery Bypass, a Simple Tool in Difficult Times. *Innovations.* 4(2):117. 2009
- [27] Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials.* 30(29):5409-16. 2009
- [28] Mondy WL, Cameron D, Timmermans JP, De Clerck N, Sasov A, Casteleyn

C, Piegler LA. Computer-aided design of microvasculature systems for use in vascular scaffold production. *Biofabrication*. 1(3):035002. 2009

[29] J. CHLUPÁČ, E. FILOVÁ, L. BAČÁKOVÁ, Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue *Physiol. Res.* 58 (2): S119-S139. 2009

[30] Dongaonkar RM, Stewart RH, Laine GA, Davis MJ, Zawieja DC, Quick CM. Venomotion modulates lymphatic pumping in the bat wing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296(6):H2015-H2021. 2009

[31] Maria Z. Siemionow, Maria Eisenmann-Klein. Plastic and Reconstructive Surgery. Part VIII: Krzysztof Kusza, Katarzyna Wawrzyniak and Jacek B. Cywinski. Anesthesia and Pathophysiology of Microcirculation. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 695-711. 2010

[32] Doraiswamy A, Narayan RJ. Vascular tissue engineering by computer-aided laser micromachining. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 368(1917):1891-912. 2010

[33] Gardner D, Li Y, Small B, Geddes JB, Carr RT. Multiple equilibrium states in a micro-vascular network. *Math Biosci*. 227(2):117-24. 2010

[34] Isogai S, Hitomi J, Yaniv K, Weinstein BM. Zebrafish as a new animal model to study lymphangiogenesis. *Anat Sci Int*. 84(3):102-11. 2009

[35] Stappenbeck TS, Miyoshi H. The role of stromal stem cells in tissue regeneration and wound repair. *Science. Review*. 324(5935):1666-9. 2009

[36] de With MC, de Vries AM, Kroese AB, van der Heijden EP, Bleys RL, Segal SS, Kon M. Vascular anatomy of the hamster retractor muscle with regard to its microvascular transfer. *Eur Surg Res*. 42(2):97-105. 2009

[37] De Oliveira LB, Bampi VF, Gomes CF, De Souza MA. Angioarchitecture of squamous cell carcinoma from hamster buccal pouch: a scanning electron microscopy study. *Scanning*. 31(5):188-94. 2009

[38] Mehta M, Waner M, Fay A. Amniotic membrane grafting in the management of conjunctival vascular malformations. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 25(5):371-5. 2009

- [39] Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, Baffi JZ, Yamada K, Kaneko H, Green MG, Chappell J, Wilting J, Weich HA, Yamagami S, Amano S, Mizuki N, Alexander JS, Peterson ML, Brekken RA, Hirashima M, Capoor S, Usui T, Ambati BK, Ambati J. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med.* 15(9):1023-30. 2009
- [40] Chen W, Li S, Chung SH, Gillies MC. Retinal vascular changes after glial disruption in rats. *J Neurosci Res.* 88(7):1485-99. 2010
- [41] Ganesan P, He S, Xu H. Analysis of retinal circulation using an image-based network model of retinal vasculature. *Microvasc Res.* 80(1):99-109. 2010
- [42] Luca Formaggia, Alfio Quarteroni and Alessandro Veneziani . *Cardiovascular Mathematics. Part1: Marc Thiriet and Kim H. Parker. Physiology and pathology of the cardiovascular system: A physical perspective. Volume 1, 1-45.* 2009
- [43] Choi YS, Matsuda K, Dusting GJ, Morrison WA, Dilley RJ. Engineering cardiac tissue in vivo from human adipose-derived stem cells. *Biomaterials.* 31(8):2236-42. 2010
- [44] Imachi K, Chinzei T, Abe Y, Isoyama T, Mabuchi K, Ono T, Kouno A, Imanishi K, Kusakabe M, Onuma M, et al. Development of a new apparatus to observe microcirculation chronically in continuous flow blood pump research. *Artif Organs.* 19(7):725-8. 1995
- [45] Imachi K, Chinzei T, Abe Y, Isoyama T, Mabuchi K, Imanishi K, Baba K, Kouno A, Ono T, Kusakabe M, et al. A new apparatus for chronic observation of the microcirculation in situ to evaluate artificial organ performance. *ASAIO J.* 1994 Jul-Sep;40(3):M757-61. 1994
- [46] Imachi K, Shuichi M, Atsushi B, Takashi I, Itsuro S, Koki T, Tsuneo C, Yasuyuki S, Tomoyuki Y, Yusuke A. Development of Implantable Probe for Observation of Microcirculation. *Biocybanetics and Biomedical Engineering.* Vol27 pp45-52, 2007

- [47] Jukes JM, van Blitterswijk CA, de Boer J. Skeletal tissue engineering using embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med. Review.* 4(3):165-80. 2010
- [48] Barralet J, Gbureck U, Habibovic P, Vorndran E, Gerard C, Doillon CJ. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release. *Tissue Eng Part A.* 15(7):1601-9. 2009
- [49] Vigier S, Helary C, Fromigue O, Marie P, Giraud-Guille MM. Collagen supramolecular and suprafibrillar organizations on osteoblasts long-term behavior: benefits for bone healing materials. *J Biomed Mater Res A.* 94(2):556-67. 2010
- [50] Ku SH, Park CB. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials.* 31(36):9431-7. 2010
- [51] Wei, L. Li, D.-C. Wang, J. Hou, X. Compatibility of osteoblasts on the polylactic acid-chitosan fiber/hydroxyapatite-calcium silicate composite scaffold material. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research.* 14(8): 1397-401. 2010
- [52] Al-Munajjed AA, Plunkett NA, Gleeson JP, Weber T, Jungreuthmayer C, Levingstone T, Hammer J, O'Brien FJ. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 90(2):584-91. 2009
- [53] Suárez-González D, Barnhart K, Saito E, Vanderby R Jr, Hollister SJ, Murphy WL. Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 95(1):222-34. 2010
- [54] Xu C, Wang Y, Yu X, Chen X, Li X, Yang X, Li S, Zhang X, Xiang AP. Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 88(1):264-73. 2009
- [55] Mathew Peter, Pandian Thodi Sudheesh Kumar, Nelson Sathy Binulal,

Shanti V. Nair, Hiroshi Tamura, Rangasamy Jayakumar. Development of novel α -chitin/nanobioactive glass ceramic composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*. 78(4): 926-31. 2009

[56] Xu C, Su P, Chen X, Meng Y, Yu W, Xiang AP, Wang Y. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 32(4):1051-8. 2011

[57] Schussler O, Chachques JC, Mesana TG, Suuronen EJ, Lecarpentier Y, Ruel M. 3-dimensional structures to enhance cell therapy and engineer contractile tissue. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 18(2):188-98. 2010

[58] Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol. Review*. 33(1):27-34. 2005

[59] 井上雄介、斎藤逸郎、中川英元、磯山隆、三浦英和、河野明正、小野俊哉、山口さち子、時偉、岸亜由美、阿部裕輔、井街宏、血管新生観察のための埋め込み型超小型観察装置の開発、Vol137-2 S36、2008

[60] 丹波章、井伊一夫、梅田誠、大野忠夫、沖垣達、西義介、増井徹、組織培養の技術 [基礎編]、朝倉書店、1982

[61] 丹波章、井伊一夫、梅田誠、大野忠夫、沖垣達、西義介、増井徹、組織培養の技術 [応用編]、朝倉書店、1982

[62] 許南浩、細胞培養なるほど Q&A、羊土社、2004

[63] 渡辺利雄、バイオ実験イラストレイテッド細胞培養、秀潤社、1996

[64] Omoto T, Minami K, Muramatsu T, Kyo S, Korfer R, Pseudoaneurysm after heart transplantation with history of LVAD driveline infection. *Ann Thorac Surg*. 72(1):263-4. Supplemental perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial.

[65] Belda FJ, Aguilera L, Garcia de la Asuncion J, Alberti J, Vicente R, Ferrandiz L, Rodriguez R, Company R, Sessler DI, Aguilar G, Botello SG, Orti R; Spanish Reduccion de la Tasa de Infeccion Quirurgica Group. *JAMA*.

294(16):2035-42. 2005

[66] Surgical management of Novacor drive-line exit site infections. Pasque MK, Hanselman T, Shelton K, Kehoe-Huck BA, Hedges R, Cassivi SD, Ewald GA, Rogers JG. *Ann Thorac Surg.* 74(4):1267-8. 2002 Oct