

## 230 培養筋管細胞の収縮動態の定量評価

Quantitative evaluation of dynamic state of cultured myotube contraction

○ 林宏行 (阪工大院), 正 山崎健一 (阪工大院), 小林裕之 (阪工大院), 宇戸禎仁 (阪工大院),  
江橋具 (国立循環器病七), 正 近藤英雄 (阪工大院), 正 橋本成広 (阪工大院), 藤里俊哉 (阪工大院)

Hiroyuki HAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, 535-8585

Kenichi YAMASAKI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Hiroyuki KOBAYASHI, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Sadahito UTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Tomo EHASHI, Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center

Hideo KONDO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Shigehiro HASHIMOTO, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Toshia Fujisato, Graduate School of Engineering, Osaka Institute of Technology

Key Words: C2C12, Contraction, Electrical pulse, Chronaxie, Actuator

### 1. 緒言

近年、医療分野でマイクロマシンが使用されつつある。マイクロマシンを駆動させるためにはアクチュエータが必要となるが、従来の機械式アクチュエータは大きく、電源が必要であることから、小型、小電力で駆動するアクチュエータの開発が望まれている。生体筋は機械的アクチュエータとは異なり、アクチン、ミオシンの働きにより主に化学エネルギーを機械エネルギーに変換して駆動するため、小型化および省電力化が可能となる。このことから、我々は筋芽細胞を培養することによって作製した培養筋をアクチュエータとして利用する試みを進めている。培養筋をアクチュエータとして利用するためには、培養筋の収縮弛緩を制御する必要がある。これまで筋管細胞や培養筋の収縮弛緩を電気パルスで制御する試み<sup>(1)</sup>が報告されているが、その刺激条件と筋管細胞の収縮弛緩との関係は未だ明らかでない。そこで本研究では、培養筋の収縮を制御するための刺激の大きさ、周波数、パルス幅および筋管細胞に対する刺激の方向性について検討し、筋管細胞収縮の動態変化を定量的に評価した。

### 2. 実験方法

#### 2-1. 細胞培養

筋芽細胞としてマウス横紋筋由来株化細胞 C2C12 細胞を使用した。C2C12 細胞を  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 60 mm コラーゲンコートディッシュに播種した。培養液には 10% ウシ胎児血清、抗生物質を含む High-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HG-DMEM) を使い、37°C, CO<sub>2</sub> 5% の環境下でコンフルエントになるまで培養した。その後、筋芽細胞の融合を促進させるため、培養液を 7% ウマ血清、抗生物質を含む HG-DMEM (DM) に変更し、引き続き培養した。培養液の交換は 2 日毎に行い、その際に位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察した。

#### 2-2. 筋管細胞収縮の周波数応答性の評価

電気パルスに対する筋管細胞収縮の周波数応答性を調べた。図 1 に実験システムの概要図を示す。分化誘導から 6 日後に、ディッシュに白金平板電極を互いに向き合うように設置し、Waveform generator を用いて培養液中にパルス電圧を印加した。電界方向は筋管細胞の長軸に対して平行 (Parallel)、および垂直 (Vertical) とした。入力電圧を 20

V<sub>pp</sub>、パルス幅 10 msec とし、周波数を 0.5 Hz から 10 Hz まで変化させたときの筋管細胞の収縮の動態を位相差顕微鏡画像で観察し、コンピュータに動画を取り込んだ。取り込んだ動画をフレームごとの静止画に変換し、画像を Grayscale に変換した。収縮弛緩が見られる細胞の輪郭付近を選択し、その領域の Grayscale の平均値を求めた。さらに、Grayscale の平均値の時間変化をフーリエ変換し、周波数スペクトルを求めた。

#### 2-3. 基電流およびクロナキシー測定

分化誘導から 6 日後に周波数を 1 Hz とし、入力電圧およびパルス幅を変化させ、筋管細胞が収縮弛緩するときのそれぞれの値を調べた。ディッシュと直列に 100 Ω の抵抗を接続し、その両端の電圧を測定することによって回路中に流れる電流を算出した。筋管細胞が収縮弛緩し始めるときの電流とパルス幅との関係 (Strength-Duration curve) を求めた後、最小二乗法によって Weiss の近似式<sup>(2)</sup>に近似し、基電流とクロナキシーを求めた。実験は 37°C、大気中で行った。また周囲溶液には 10% ウシ胎児血清、抗生物質、25mM HEPES を含む HG-DMEM を使用した。

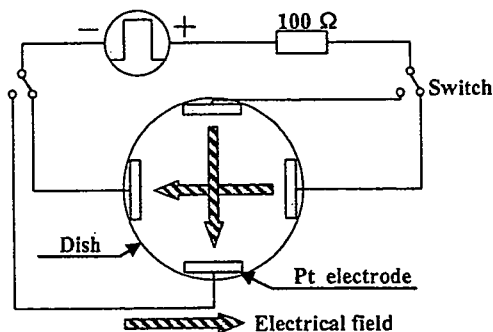


Fig.1 Schematic drawing of experimental system

### 3. 結果

図 2 にコンフルエント時と分化誘導から 6 日後の C2C12 細胞の位相差顕微鏡画像を示す。コンフルエントに達した後、培養液を DM に変更することで、単核の筋芽細胞が細長い筋管細胞に変化している様子が観察された。

電気パルスを加えた結果、ParallelではGrayscaleの平均値が周期的に変化したが、Verticalでは周期的な変化は見られなかった。また、ここには示していないが10 Hzでは入力開始時にGrayscaleの平均値が上昇し入力停止時に減少した。図3にGrayscaleの平均値の時間変化をフーリエ変換した結果を示す。Parallelの0.5 Hz、1 Hz、3 Hzにおいて入力信号と同様の周波数でスペクトルのピークが見られた。しかし、5 Hzにおいてはピークは確認できなかった。

図4にParallelおよびVerticalの基電流およびクロナキシーの結果を示した。Parallelの基電流はVerticalに比べて有意に小さかった。またParallelのクロナキシーはVerticalに比べて小さい傾向を示していた。



Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells.

(a) Confluence,  
(b) 6 days after differentiation induction,  
bar=100 μm

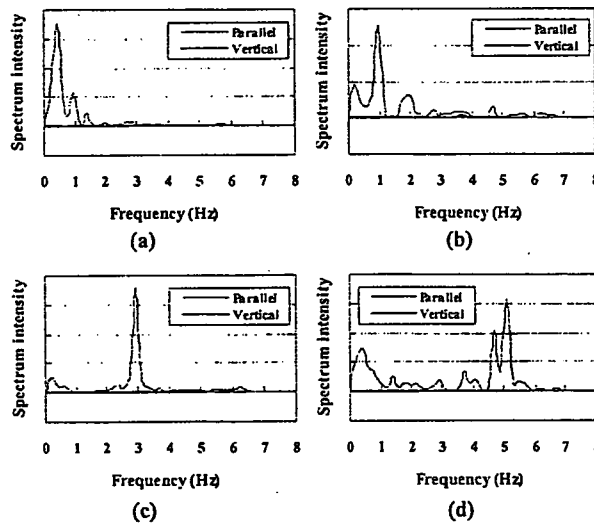


Fig.3 Results of Fourier transform.

(a) 0.5 H, (b) 1 Hz, (c) 3 Hz, (d) 5 Hz

#### 4. 考察

本実験において筋管細胞の収縮は0.5 Hzから3 Hzまで周期的に変化した。フーリエ変換の結果、入力信号と同様の周波数でスペクトルのピークが見られたが、5 Hzではスペクトルのピークは確認できなかった。また10 Hzでは入力開始時にGrayscaleの平均値が上昇し入力停止時に減少した。このことより、周波数5 Hz以上では生体筋で見られる強縮が生じていたと考えられる。生体の運動においては強縮が用いられており、これにより大きな力を発生することができる。よって、培養筋をアクチュエータとして利用する場合、周波数による強縮が重要であると考えられる。

パルス電気刺激により、筋を収縮弛緩させるために必要な電流値を基電流といい、最小の電気エネルギーで筋を収縮弛緩させるために必要なパルス幅をクロナキシーという<sup>(2)</sup>。ParallelはVerticalに比べて基電流およびクロナキシーが小さかった。このことは筋管細胞の長軸に対して平行に電界を生じさせることにより、低い電気エネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることを示唆している。

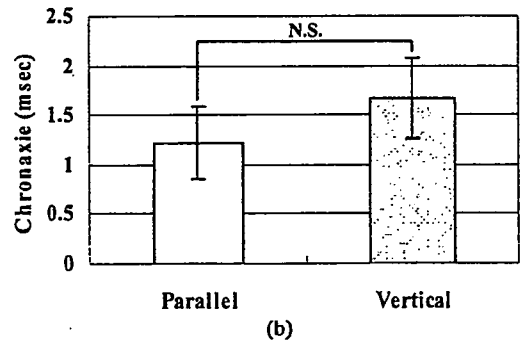
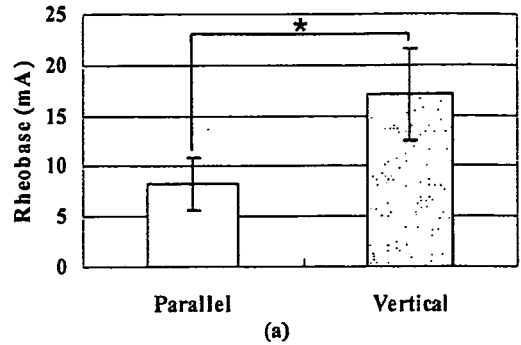


Fig.4 Results of Rheobase and Chronaxie.

(a) Rheobase ( $*p < 0.01$ , Parallel:n=9, Vertical:n=4),  
(b) Chronaxie ( $p = 0.081$ , Parallel:n=9, Vertical:n=4)

#### 5. 結言

本実験より、以下の結言を得た。

1. 電気パルス刺激の周波数により筋管細胞の収縮動態が変化することがわかった。
2. 筋管細胞には電界に対する異方向性があり、筋管細胞の長軸に対して平行に電界を生じさせることにより、低い電気エネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることが示唆された。

#### 謝辞

本研究は文部科学省学術フロンティア「培養筋の医工学応用」の助成により行われた。

#### 参考文献

- (1) Mario Marotta et al. Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells. *Bio Techniques* 2004 ; 36 : 68-73
- (2) L.A. Geddeset, J.D.Bourland. The Strength-Duration Curve. *IEEE Transactions On Biomedical Engineering*. *Biol Anim.*1985 ; BME-32 ; 6 : 458-459

### 一般演題13

#### 異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発

大阪工業大学1)、国立循環器病センター2)、東京医科歯科大学3)、物質材料研究機構4)  
○藤里俊哉1)、寺田堂彦1)、湊谷謙司2)、山崎健一1)、林 宏行1)、江橋 具2)、小林尚  
俊4)、岸田晶夫3)、山岡哲二2)、中谷武嗣2)、北村惣一郎2)

われわれは、異種組織から細胞成分等を除去し、マトリックス成分のみが残存した多孔質構造体を組織再生のテンプレートとして用いる再生医療技術を開発している。移植後に自己組織化され、患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。血管、心臓弁の他、角膜や筋肉、神経、皮膚等のテンプレート作成について報告する。

ミニブタやラットから各種組織を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた980MPaの超高圧印加による細胞破壊処理、及び残渣成分の洗浄除去処理を行うことで細胞成分を除去した。血管、心臓弁では、組織内のエラスチン線維も酵素によって除去した。得られたテンプレートを、同種あるいは異種動物に同所性に移植した。また、テンプレートへの細胞組み込みについても検討した。

下行大動脈の同種移植では、移植12ヶ月後に移植時の約1.5～2倍の大きさとなり、グラフト前後の血管と完全に一体化していた。内腔は内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋及び線維芽細胞の浸潤を認めた。角膜実質部ミニブタ組織のウサギへの異種移植では、軽微な炎症反応を認めたものの、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。筋組織では、筋芽細胞を播種した後で筋管細胞へと分化させることによって、生体外で電気刺激にて収縮挙動を示すことを確認した。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、科学技術振興調整費、及び文部科学省学術フロンティア事業の補助を受けて実施された。

## 生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生

大阪工業大学、国立循環器病センター1)、東京医科歯科大学2)、物質材料研究機構3)

○藤里俊哉、寺田堂彦、湊谷謙司1)、山崎健一、林 宏行)、近藤英雄、江橋 具1)

小林尚俊3)、岸田晶夫2)、山岡哲二1)、中谷武嗣1)、北村惣一郎1)

われわれは、生物由来素材を臓組織再生用のスキャフォールドとして用いる再生医療技術を開発している。プラスチックや金属などとは異なり、本スキャフォールドは移植後にリモデリングされることによって、患者の成長に伴う臓組織の成長が期待できる。本報告では、血管、心臓弁、筋肉、角膜、皮膚等のスキャフォールド作成と、その細胞ハイブリッド化について述べる。

ミニブタやラットから各種組織を採取した。洗浄後、冷間等方圧加圧装置を用いた980MPaの超高压印加による細胞破壊処理、及び残渣成分の洗浄除去処理を行うことで生物由来素材スキャフォールドを作成した。さらに、血管、心臓弁では、組織内のエラスチン線維も酵素によって除去した。また、市販のコラーゲン溶液から再構成したコラーゲン多孔質体もスキャフォールドとした。スキャフォールドの細胞ハイブリッド化は、回転培養法を用いた表面播種の他、組織内への細胞注入も検討した。

血管、心臓弁では細胞ハイブリッド化せずにスキャフォールドのみの同種移植を行ったところ、移植12ヶ月後に移植時の約1.5～2倍の大きさとなり、スキャフォールド前後の血管と完全に一体化していた。内腔は内皮細胞によって覆われ、組織内は平滑筋及び線維芽細胞の浸潤を認めた。角膜実質部ミニブタ組織のウサギへの異種移植では、軽微な炎症反応を認めたものの、透明性を維持しつつ周囲組織に定着していた。筋組織では、筋芽細胞をハイブリッド化した後で筋管細胞へと分化させると、生体外で電気刺激に応じた収縮挙動を示し、その収縮力を測定することができた。スキャフォールド内部への細胞ハイブリッド化方法として、薬物インジェクタを使用したところ、スキャフォールド内へ注入された細胞の生着が認められた。

生物由来素材スキャフォールドは、種々の臓組織再生のための基材として有効であると考えられる。

本研究は厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費、科学技術振興調整費、及び文部科学省学術フロンティア事業の補助を受けて実施された。

P-166 脱エラスチン化血管組織をスキヤフォールドとして用いた動脈組織再生

寺田 堂彦<sup>2</sup>, 澤田 和也<sup>3</sup>, 緒方 裕之<sup>1</sup>, 平工 香織<sup>4</sup>, 鎌田和加子<sup>1</sup>, 吉田 謙一<sup>1</sup>, 松本 誠一<sup>1</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>, 岸田 晶夫<sup>3</sup>, 山岡 哲二<sup>3</sup>, 中谷 武嗣<sup>3</sup>

<sup>1</sup>大阪工業大学工学部生体医工学科, <sup>2</sup>ヒューマンサイエンス振興財団, <sup>3</sup>大阪成蹊短期大学, <sup>4</sup>国立循環器病センター, <sup>5</sup>東京医科歯科大学

現在、臨床においては年間約5万本もの人工血管が使用されている。しかしながら、成長機能の欠如から小児患者への適用には問題が残されており、再生型人工血管の開発が依然として望まれている。我々は再生型人工血管の開発を目的とし、ブタ大動脈組織を由来とするバイオスキヤフォールドに関する研究を行った。血管組織試料としてブタ大動脈（ジャバンファーム）を用いた。120度C、24時間の熱脱水架橋を施した血管組織に対し、エラスターゼ/トリプシン緩衝液（0.57 μg/ml; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 0.02%; pH 8, 37度C）中で72時間振盪処理を行い、エラスチンを分解除去した。その後、エタノール（80 v%, 37度C; 72時間）処理によってリン脂質を抽出除去した。作製した脱エラスチン化動脈組織を用いて同種ミニブタへの置換移植実験を行った結果、移植期間3ヶ月の時点でグラフトに瘤および石灰化は認められず、無数のレシビエント由来平滑筋細胞の浸潤が確認された。6ヶ月ではグラフト内にわずかに石灰化が認められた。MTC染色では、6ヶ月でエラスチン繊維の再形成は認められなかった。弾性繊維の豊富な動脈組織の再生には、さらに長期経過の観察が必要であると考えられる。本方法により作製されたグラフトは再細胞化能と石灰化抑制効果を有しており、再生型バイオスキヤフォールドとしての有効性が示された。

P-187 ポリプロピレン繊維-コラーゲンゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養

奈良 雅尚<sup>1</sup>, 山崎 健一<sup>1</sup>, 寺田 堂彦<sup>2</sup>, 澤田 和也<sup>3</sup>, 近藤 英雄<sup>1</sup>, 橋本 成広<sup>1</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, <sup>2</sup>ヒューマンサイエンス振興財団, <sup>3</sup>大阪成蹊短期大学総合生活学科

【緒言】生体の筋組織は出力対重量比が大きく、アクチュエータとして優れた特性を有する。培養した筋細胞をアクチュエータとして使用するためには、筋組織と同様に筋細胞を高密度に集積させ、一方向に配向させる必要がある。そこで、培養筋を作製するためのスキヤフォールドとして繊維-ゲル複合体に着目した。繊維-ゲル複合体は繊維そのものが強度を有しており、ある程度大きさを制御することが可能である。さらに、繊維に沿って細胞が配向すると期待される。これらのことから、本研究では繊維-ゲル複合体を用いた筋芽細胞の三次元培養を行い、スキヤフォールドとしての有用性を評価した。【方法】繊維にはポリプロピレン繊維を用いた。繊維を等間隔に配列させ、その上にコラーゲンゲルを形成した。マウス横紋筋由来の株化細胞であるC2C12細胞を播種し、10%ウシ胎児血清と抗生物質を含むHG-DMEMで培養した。分化誘導してから1週間後に電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮動態を調べた。【結果および考察】スキヤフォールド上で細胞が増殖し、筋管細胞に分化している様子が見られた。入力電圧30 Vp-p, 周波数1 Hz, パルス幅10 msecの電気パルスを培養液中に印加したところ、培養筋が周波数に同期して収縮する様子が観察された。電気パルスによって収縮弛緩したことから、繊維-ゲル複合体は培養筋のスキヤフォールドとして有用であることが示唆された。

P-188 脱エラスチン組織-コラーゲンゲル複合体を足場としたC2C12細胞の3次元培養

山崎 健一, 寺田 堂彦, 奈良 雅尚, 近藤 英雄, 橋本 成広, 藤里 俊哉

大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻

【目的】我々はこれまで、脱エラスチン化生体組織を用いて、筋芽細胞を培養してきた。脱エラスチン化生体組織は形状の制御が比較的容易で、強度がコラーゲンゲルに比べて高いという利点がある。しかし、培養筋を占める細胞外基質量が多く、筋の収縮を妨げることが危惧される。一方、コラーゲンゲルは細胞外基質の割合が脱エラスチン化生体組織に比べて少ないが、強度が弱いなどの欠点がある。そこで、互いの利点を生かすために、脱エラスチン化生体組織-コラーゲンゲル複合体を作製し、培養筋としての機能を評価した。【方法】脱エラスチン化生体組織として、ブタの大動脈を使用した。脱エラスチン化生体組織をキルシュナー鋼線に固定し、2つの脱エラスチン化生体組織の間にC2C12細胞を包埋したコラーゲンゲルを形成した。10%牛胎児血清を含むDMEMで3日間培養した後、C2C12細胞の分化を促進させるため7%馬血清を含むDMEMで6日間培養した。培養後、電気パルス刺激を行い、培養筋の収縮弛緩動態を観察した。【結果】培養9日後、ゲルが脱エラスチン化生体組織を覆うように収縮した。電気パルス刺激を与えたところ、培養筋が周期的に収縮弛緩した。【結論】今回用いた複合体scaffoldは培養筋の足場として有用であることが示唆された。今後は強度や収縮力を脱エラスチン化生体組織のみの場合と比較して、詳しく検討する予定である。

P-190 電界に対する培養筋管細胞の異方性

林 宏行<sup>1</sup>, 山崎 健一<sup>1</sup>, 小林 裕之<sup>1</sup>, 宇戸 禎仁<sup>2</sup>,  
近藤 英雄<sup>1</sup>, 橋本 成広<sup>1</sup>, 藤里 俊哉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, <sup>2</sup>大阪工業大学  
大学院工学研究科電気電子工学専攻

【緒言】我々は小型、省電力なアクチュエータ作製を目指し、培養した筋芽細胞から作製した培養筋をアクチュエータとして使用する試みを進めている。培養筋のアクチュエータ化のためには培養筋を構成する筋管細胞の収縮を制御する必要がある。現在、筋管細胞の収縮を電気パルスで制御する試みが報告されているが、その刺激条件と筋管細胞の収縮との関係は未だ明らかでない。そこで本研究では培養筋の収縮を制御するため、電気パルスの刺激の方向性について検討した。【方法】筋芽細胞としてマウス横紋筋由来株化細胞C2C12を使用した。C2C12細胞を筋管細胞へ分化させた後、培養液にパルス電圧を印加した。筋管細胞の収縮に及ぼす電界方向の影響を調べるため、筋管細胞の長軸方向と平行 (Parallel) および垂直 (Vertical) に電界を加えた。周波数を1 Hzとして、パルス幅および刺激回路中に流れる電流を変化させ、筋管細胞が収縮し始めるときの値を調べた。そしてパルス幅と電流の関係から基電流とクロナキシーを求めた。【結果および考察】 Parallelのときは、Verticalより基電流およびクロナキシーが小さかった。このことは、筋管細胞には電界に対する異方性があり、筋管細胞と平行方向に電界を生じさせることで、低いエネルギーで筋管細胞を収縮弛緩させることが可能であることを示唆している。

### O-09-3 細胞表面マーカーに基づく間葉系幹細胞の高純度化システムの開発

馬原 淳, 山岡 哲二

国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) バリアーションと高純度分離法の開発は、細胞移植治療を実現化する上で極めて重要な課題である。これまでに、MSCの表面マーカーのみならずその発現密度によって細胞を分離するリガンド固定化カラムを開発してきた。本発表では、MSCで発現している種々の抗体発現量に基づいて細胞を分離した結果と分化能力の相関について検討した結果を報告する。【実験】ポリアクリル酸を導入したシリコンチューブ (内径0.5mm) および、シランカップリング剤によりアミノ基を導入したガラスキャピラリーに抗マウスCD34抗体を固定化した。C57BL/6マウスから採取した粗精製の間葉系幹細胞 (MSC) をカラムにより分離し、Osteoblast分化能をPT-PCR法により定量した。【結果】マウスMSCを抗CD34抗体固定化カラムへ通液した結果、表面マーカー密度に基づいて溶出時間が遅延するフラクションを確認した。次に、CD34 Sca-1,CD44の発現密度を評価した結果、カラムにより純化したMSCのCD34, Sca-1発現量とCD44発現量は逆の相関であることが示された。得られたフラクションに含まれるMSCをOsteoblast分化培地で4日間培養し分化関連遺伝子の発現を定量した結果、粗精製のMSCと比較して5-10倍程度高い分化能を有する細胞ポピュレーションを得ることに成功した。

### O-10-6 含水性を有するポリ乳酸系材料の抗血栓と組織浸潤性

佐々木 愛<sup>1</sup>, 柿木佐知朗<sup>1</sup>, 江橋 具<sup>2</sup>, 森反 俊幸<sup>3</sup>,  
山岡 哲二<sup>1</sup>

<sup>1</sup>国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部,  
<sup>2</sup>国立循環器病センター研究所再生医療部, <sup>3</sup>鈴鹿医療科学大学医  
工学部臨床工学科

【緒言】現在の人工血管は、劣化やそれに伴う経時的な再手術などの問題がある。一方、生体吸収性を有する再生型人工血管、特に小口径の人工血管は難治性冠動脈疾患への応用も期待される。我々は、内層がポリ-L-乳酸(PLLA)とポリエチレングリコール(PEG)とのマルチブロック共重合体、外層がPLLAのナノファイバーからなる二重構造のスキャホールドを開発している。本研究では、その抗血栓吸着性ならびに組織浸潤性について評価した。【方法】PLLAおよびマルチブロック共重合体のクロロホルム溶液から、キャスト法により厚さ150 $\mu$ mのフィルムを作製し、さらにエレクトロスピンニング法により、ナノファイバー不織布を作製した。これに対して、ウシ全血およびラットPRP(platelet rich plasma)を所定時間接触させ、血栓吸着性および血小板粘着性を評価した。【結果】キャストフィルムに対するウシ全血試験では、PLLAとマルチブロック共重合体との間に著大な違いが観察された。PLLA上では約2時間で多くの血栓の付着が確認されたが、マルチブロック共重合体では8時間後でも血栓の付着が確認されなかった。マルチブロック共重合体表面は含水したPEGが鎖により覆われており血栓の付着を効果的に抑制したと思われる。またナノファイバー不織布では多孔質構造に物理的に絡み付くように血栓が認められたものの、マルチブロック共重合体の抗血栓付着性が認められ、再生型人工血管材料として有望と思われる。

## Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing

Toshia Fujisato<sup>\*1</sup>, Kazuo Niwaya<sup>2</sup>, Kenji Minatoya<sup>2</sup>, Akio Kishida<sup>5</sup>, Takeshi Nakatani<sup>3</sup>, and Soichiro Kitamura<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Regenerative Medicine & Tissue Engineering, <sup>2</sup>Cardiovascular Surgery, <sup>3</sup>Organ Transplantation

<sup>4</sup>National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

<sup>5</sup>Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kandasugadai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan

\*E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

Received 4 December 2006/Accepted 11 December 2006

### Abstract

Tissue engineered heart valves based on acellular tissue have been studied to have more durability and bio-functionality with growth potential and less immunogenicity. Whereas they have still several problems to be solved such as complete cell removal and transfer of unknown animal related infectious diseases. In this paper, our novel tissue processing for decellularization using ultrahigh pressure for the safe tissue transplantation was reported. Porcine cardiac tissues were isolated and treated by a cold isostatic pressing for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out by washing solution at 4°C. The tissues treated were completely cell free when they were applied to 980 MPa for 10 min. There was no porcine endogenous retrovirus detected. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. The acellular grafts of pulmonary valve were transplanted to allogeneic miniature pigs. The explanted grafts showed remarkable cell infiltration and endothelialization. This processing may provide more durable and safe scaffold for the regenerative tissue transplantation.

Keywords: tissue engineering, tissue transplantation, acellular, scaffold

### 1. Introduction

The implantable cardiovascular medical devices have been clinically used for more than 30 years as substitution for the patient's deficient tissues. The artificial heart valve is one of the most clinically used medical devices applied to about 300,000 patients per year worldwide. There are two kinds of artificial heart valves currently used. A xenograft heart valve is made of the chemically crosslinked porcine valve or bovine pericardium to reduce antigenicity of the xenogeneic tissue. A mechanical heart valve is made of pyrolytic carbon or titanium. The former has good biocompatibility, hemodynamics, and resistant to infections compared with the latter. However, the durability of the xenograft valve is relatively short especially in pediatric patients for about 5-10 years by the calcification of the glutaraldehyde-fixed animal tissue. Recent establishment of the human tissue bank has made it easy to use allogeneic tissues for the transplantation that are superior to the current artificial devices. However, since they are donated from the cadavers, the supply is very limited and some donated tissues may not be applicable due to infection. In addition to the above issues, all the devices and tissues lack the growth potential and they may be replaced repeatedly through the patients' growth process.

All of the current medical devices remain as foreign bodies even after the implantation. If a device accepts host cell impregnation and is replaced by the host tissue after the implantation,



it may acquire perfect biocompatibility and growth ability. An ideal candidate for such a regenerative scaffold is a decellularized allogeneic or xenogeneic tissue since it does not require tissue fixation for removal of antigenicity. Detergents and/or enzymes such as Triton® X-100, sodium dodecyl sulphate, deoxycholate, trypsin, DNase, and RNase have been commonly used for the cell removal media from the tissue [1-4]. However, the decellularization depends on their permeation in the tissue and may not be achieved completely in large or hard tissues. And furthermore, since the detergents are generally cytotoxic and it takes time for their removal, it may lead denature of biological properties and contamination in the process. Recent BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) and vCJD (variant Creutzfeldt-Jakob disease) issues have been affecting to the tissue transplantation from the point of view of safety. In this paper, a cold isostatic pressing (CIP) was applied for removal of the cells and inactivation of viruses in the cardiovascular tissues to have scaffold for the safe regenerative tissue transplantation.

## 2. Material and methods

The porcine heart valves were isolated from 4 month-old Clawn miniature pigs (Japan Farm Co. Ltd, Kagoshima, Japan) weighing about 10 kg under the sterile condition. The harvested tissues were packed immediately in sterile bags filled with phosphate buffered saline (PBS) and treated by ultrahigh pressure of 980 MPa for 10 min using a CIP apparatus (Dr. Chef, Kobe Steel Ltd, Kobe, Japan) for cell demolition (Fig. 1). The range of temperature in the process is about 5 to 30°C. They were then rinsed by PBS for 2 weeks under gentle stirring at 4°C for removal of the residues of the broken cells. They were subjected to the histological observation by the light and electron microscopy, DNA and phospholipids assay, detection of porcine endogeneous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement.



Fig. 1 Packed porcine heart valves for CIP treatment.

The acellular tissues were transplanted orthotopically into nine allogeneic miniature pigs. The pulmonary valves were transplanted at right ventricular outflow tract through a median sternotomy with extracorporeal circulation without blood oxygenation [5]. The postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 4, 12, and 24 weeks (n=3) after the transplantation and examined histologically and immunohistologically. All animals were carefully reared in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised in 1985).

### 3. Results and discussion

The tissues were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min followed by washing for 2 weeks from the H-E staining (Fig. 2). The amount of DNA and phospholipids were lower than 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 0.5 mg/wet g, respectively and those were less than 10% in the native tissue (Fig. 3).

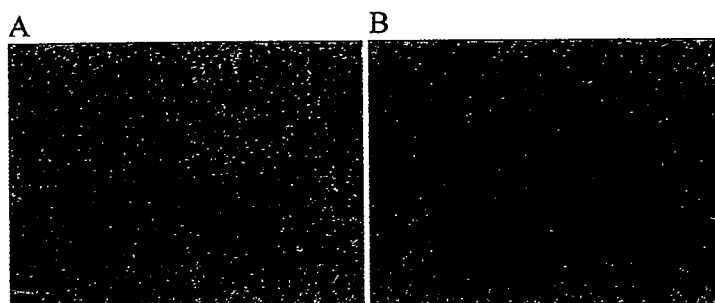


Fig. 2 Cross sections of (A) native and (B) treated tissues (H-E staining).

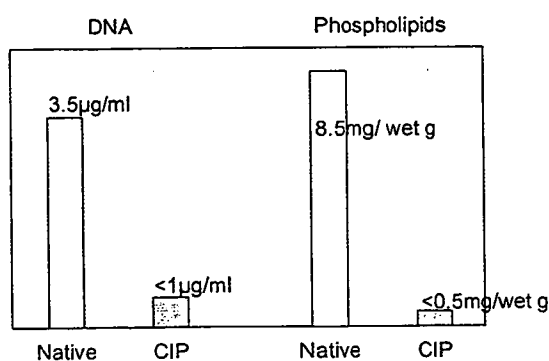


Fig. 3 Residual amounts of DNA and phospholipids in native and treated tissues.

The collagen and elastin fibers were well maintained in the acellular tissue and there were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. We have already found that this process could be successfully applied to cartilage tissues for decellularization (not shown). More effectively, it has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP only of more than 600 MPa without washing [6]. This means the treatment is able to sterilize the tissue in addition to the decellularization. The Claw miniature pig was chosen as a donor animal since its size adapts human tissues well and its genome has been well studied in order to develop a human gene induced transgenic animal for the organ transplantation. There was no PERV detected in PCR assay from the tissue treated (Fig. 4).

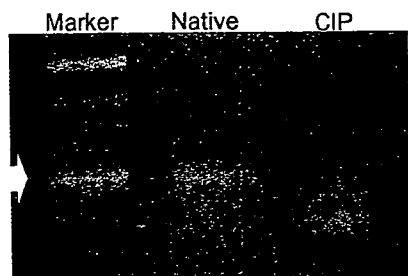


Fig. 4 PCR products of PERV (arrow) in native and treated tissues.

The animals survived after the transplantation in the all cases. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by cells from both sides of endothelium and outer tissue after 12 weeks. It was dominant in the latter. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells at 24 weeks, mainly by smooth muscle cells (Fig. 5). There was no inflammation and calcification observed in the tissue.

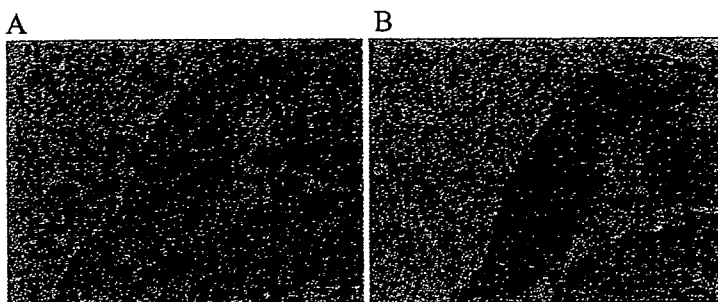


Fig. 5 Cross sections of (A) anti-vWF (endothelial cells) and (B) anti- $\alpha$ SMA (smooth muscle cells) immunostained treated tissues 24 weeks after the transplantation.

Recently, some groups have reported excellent clinical results of acellular pulmonary heart valve transplantation [7-9]. We are planning a clinical application of the acellular grafts made by this process in the near future.

#### 4. Conclusion

Porcine cells and PERV were removed completely by the CIP treatment without using any detergents. The acellular grafts showed remarkable ability in repopulation after the transplantation. This CIP treatment may have more secure acellular graft for the regenerative tissue transplantation.

#### 5. Acknowledgement

This study was supported by the Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

#### 6. References

- [1] Bader, A., Schilling, T., Teebken, O.E., Brandes, G., Herden, T., Steinhoff, G., and Haverich, A. (1998) Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur. J. Cardiothorac Surg.* 14 (3), 279-284.
- [2] O'Brien, M.F., Goldstein, S., Walsh, S., Black, K.S., Elkins, R., and Clarke, D. (1999) The SynerGraft valve: a new acellular (nongluteraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 11 (4 Suppl 1), 194-200.
- [3] Steinhoff, G., Stock, U., Karim, N., Mertsching, H., Timke, A., Meliss, R.R., Pethig, K., Haverich, A., and Bader, A. (2000) Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 102 (19 Suppl 3), III50-55.
- [4] Booth, C., Korossis, S.A., Wilcox, H.E., Watterson, K.G., Kearney, J.N., Fisher, J., and Ingham, E. (2002) Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J. Heart Valve Dis.* 11 (4), 457-462.

- [5] Numata, S., Fujisato, T., Niwaya, K., Ishibashi, U.H., Nakatani, T., and Kitamura, S. (2004) Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved Allograft. *J. Heart Valve Dis.* 13, 984-990.
- [6] Hatashi, R. (2002) High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value. *Biochem Biophys Acta* 1595, 397-399.
- [7] Tavakkol, Z., Gelehrter, S., Goldberg, C.S., Bove, E.L., Devaney, E.J., and Ohye, R.G. (2005) Superior durability of SynerGraft pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann. Thorac. Surg.* 80 (5), 1610-1614.
- [8] Cebotari, S., Lichtenberg, A., Tudorache, I., Hilfiker, A., Mertsching, H., Leyh, R., Breymann, T., Kallenbach, K., Maniuc, L., Batrinac, A., Repin, O., Maliga, O., Ciubotaru, A., and Haverich, A. (2006) Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 114 (1 Suppl), I132-137.
- [9] Erdbrugger, W., Konertz, W., Dohmen, P.M., Posner, S., Ellerbrok, H., Brodde, O.E., Robenek, H., Modersohn, D., Pruss, A., Holinski, S., Stein-Konertz, M., and Pauli, G. (2006) Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. *Tissue Eng.* 12 (8), 2059-2068.

ORIGINAL ARTICLE

Tsuyoshi Kimura, PhD · Sayaka Iwai  
Toshiyuki Moritan, PhD · Kwangwoo Nam, PhD  
Shingo Mutsuo · Hidekazu Yoshizawa, PhD  
Masahiro Okada, PhD · Tsutomu Furuzono, PhD  
Tosihya Fujisato, PhD · Akio Kishida, PhD

## Preparation of poly(vinyl alcohol)/DNA hydrogels via hydrogen bonds formed on ultra-high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery

**Abstract** Poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogels interacting with DNA mediated by hydrogen bonds (PVA/DNA hydrogel) were developed using ultra-high pressure (UHP) technology. The goal was to create a new method of gene delivery by controlled release of DNA. Mixed solutions of DNA and PVA at various concentrations were pressurized at 10000 atmospheres at 37°C for 10min. PVA/DNA hydrogels with good formability were produced at PVA concentrations of more than 5% w/v. The presence of DNA in the obtained hydrogels was confirmed by spectroscopic analysis and nucleic acid dye staining. DNA release from the hydrogels was investigated using PVA/DNA hydrogel samples of 5% and 10% w/v formed by UHP treatment or by conventional freeze–thaw methods. The DNA release curves from both types of samples showed a rapid phase in the initial 15h followed by a sustained release phase. However, there was a difference in the amount of DNA released. Less DNA was released by the pressurized hydrogels than by the freeze–thaw hydrogels. Also, the cumulative amount of DNA released decreased as the PVA content in the hydrogels increased. These results indicate that DNA release from the hydrogels can be modulated by changing

the preparation method and the PVA content. Furthermore, it was demonstrated that DNA release could be controlled by varying the amount and duration of pressurizing used to form the hydrogels. Intact fractions of plasmid DNA released from the hydrogels were separated by agarose gel electrophoretic analysis. These results suggest that, using controlled release, DNA from PVA/DNA hydrogels formed by UHP treatment can be transfected into cells.

**Key words** Controlled release · Ultra-high pressure · DNA · Hydrogel · Poly(vinyl alcohol)

Received: March 31, 2006 / Accepted: November 18, 2006

T. Kimura · K. Nam · A. Kishida (✉)  
Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan  
Tel. and Fax +81-3-5280-8028  
e-mail: kishida.fm@tmd.ac.jp

S. Iwai · T. Moritan  
Department of Medical Engineering, Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Japan

S. Mutsuo · H. Yoshizawa  
Department of Environmental Chemistry and Materials, Okayama University, Okayama, Japan

M. Okada · T. Furuzono  
Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

T. Fujisato  
Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

### Introduction

Safe and biocompatible synthetic materials have been developed as biomaterials.<sup>1</sup> In gene therapy, nonviral synthetic gene carriers have been the focus of attention due to their biological safety advantages over viruses.<sup>2</sup> In many cases, cationic synthetic materials, such as cationic lipids, liposomes,<sup>3</sup> polyethyleneimine,<sup>4</sup> polyamideamine dendrimer,<sup>5</sup> poly-L-lysine (PLL), PLL derivatives,<sup>6</sup> and other cationic peptides,<sup>7</sup> have been used as nonviral vectors. It is possible to form complexes between these materials and DNA using the electrostatic interaction between their cationic groups and the anionic groups of DNA, making the DNA robust against nuclease degradation and enabling effective transfection into mammalian cells.<sup>8,9</sup> However, the cytotoxicity of cationic materials was reported to be a significant problem.<sup>10,11</sup> For safer and more efficient gene delivery, it is necessary to develop a noncationic or less cationic gene carrier through nonelectrostatic interaction with DNA. Sakurai et al. reported that a triple helical complex of single-strand DNA and double-strand schizophyllan, which is a kind of polysaccharide ( $\beta$ -1,3 glucan), was formed through hydrogen bonding.<sup>12</sup> In addition, we previously reported that nanoparticles of poly(vinyl alcohol) (PVA) bonded to DNA via hydrogen bonds were obtained when mixed solutions of PVA (less than 0.01% w/v) and DNA were treated under ultra-high pressure (UHP) at

10000 atmospheres (980 MPa) and 40°C for 10 min.<sup>13</sup> It is well known that intra- and intermolecular hydrogen bonding increases in these conditions.<sup>14</sup> The PVA/DNA nanoparticles could be internalized into mammalian cells, suggesting that they have utility as a novel nonviral vector that uses nonelectronic interactions.

Recently, controlled release of DNA was also investigated as a possible method of enhancing transfection efficiency using various biomaterials such as poly (lactide-co-glycolide) (PLGA),<sup>15</sup> hyaluronic acid,<sup>16</sup> atelocollagen,<sup>17</sup> and gelatin.<sup>18,19</sup> Shea et al. reported that the sustained delivery of DNA from PLGA led to effective transfection of a large number of cells in vitro and in vivo.<sup>15</sup> However, it was difficult to regulate the release of DNA owing to the lack of interaction forces, such as covalent, electrostatic, and hydrogen bonding, with which DNA molecules are loaded into PLGA with polymer molecules. Tabata et al. reported enhancement and prolongation of gene expression using a cationized gelatin hydrogel interacting with DNA electrostatically.<sup>18,19</sup> The controlled release of DNA depended on hydrogel degradation, but the cationized gelatin hydrogel was crosslinked by glutaraldehyde, which has generally cytotoxic properties, to obtain different degrees of cationization.

In the present study, we report the preparation of a novel PVA hydrogel with DNA crosslinked physically by hydrogen bonds using UHP technology and its application to the controlled release of DNA. The goal is to develop an effective, low-cytotoxic and gene-releasable biomaterial. PVA/DNA hydrogels were obtained for various pressurization conditions, temperatures, and processing times. DNA release from the hydrogels was investigated in vitro. PVA is widely used for biomedical applications because of its biocompatibility and neutrally charged nature.<sup>20</sup> It is also known that PVA hydrogel is formed by physical crosslinking with hydrogen bonds when PVA solution is frozen and thawed several times, which is called the freeze-thaw method.<sup>21</sup>

## Materials and methods

### Materials

In our experiments, we used PVA samples with an average molecular weight of 74800 and a degree of saponification of 99.8%, as supplied by Kuraray (Osaka, Japan). We also used salmon sperm DNA purchased from Wako (Osaka, Japan), plasmid DNA encoding enhanced green fluorescence protein under a cytomegalovirus promoter (pEGFP-N1, BD Science, Palo Alto, CA, USA), and nucleic acid staining dye solution (Mupid Blue) obtained from Advance (Tokyo, Japan).

### Preparation of PVA/DNA hydrogels by UHP

Aqueous PVA solutions of 6%, 8%, 10%, 14%, and 20% w/v were prepared by autoclaving three times for 30 min at

121°C. Salmon sperm DNA was dissolved in a Tris-EDTA buffer (TE, pH = 7.8) at a concentration of 16.3 mg/ml. The DNA solution was mixed with PVA solutions of 10%, 14%, and 20% w/v at a ratio of 1:1. The 0.7-ml samples were transferred in silicon tubes (9 × 25 mm) with both ends capped by silicon plugs. The tubes were pressurized under various UHP conditions, using different pressures, temperatures, and durations, in a high-pressure machine (Kobe Steel, Kobe, Japan).

### Confirmation of the presence of DNA in the PVA/DNA hydrogels

The presence of DNA in the PVA/DNA hydrogels produced by UHP treatment was confirmed by nucleic acid dye staining and UV-visible spectroscopy. For the former method, the PVA/DNA hydrogels were immersed in nucleic acid dye solution for 1 min and then transferred to 70% ethanol. After 1 min, they were immersed in ion-exchanged water for 1 min. For the latter method, after the PVA/DNA hydrogels were melted at 90°C for 10 min, their DNA concentration was measured by a spectrophotometer (V-560, JASC, Tokyo, Japan).

### DNA release from hydrogels

The PVA/DNA hydrogels prepared by UHP were immersed in 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) for 144 h at 37°C. At 0.25, 0.5, 2, 3, 15, 27, 48, 111, and 144 h, 20 µl of the samples in the outer part of the PBS solution was collected and the DNA concentration was measured spectrophotometrically at 260 nm (Gene Quant Pro S, Amersham, Tokyo, Japan).

### Stability of plasmid DNA released from hydrogels

Plasmid DNA (pDNA) was used instead of salmon sperm DNA and the mixed solutions of pDNA (100 µg/ml) and PVA (5% or 10% w/v) were treated by UHP under the conditions described above. The obtained PVA/pDNA hydrogels were immersed in PBS for 12 and 48 h, and then the samples in the outer part of the solution were collected and analyzed by agarose gel electrophoresis at 100 V for 45 min.

## Results and discussion

Aqueous solutions of PVA at concentrations ranging from 3% to 10% w/v were hydrostatically pressurized at 10000 atm at 37°C for 10 min. With a PVA solution of 3% w/v, the clear solution was transformed into a turbid and viscous solution by pressurization (Fig. 1A). An aggregation of PVA particles with an average diameter of 1 µm was observed in the PVA solution on scanning electron microscopy (SEM, data not shown). For PVA concentrations of more than 4% w/v, hydrogels were produced on pressuriza-

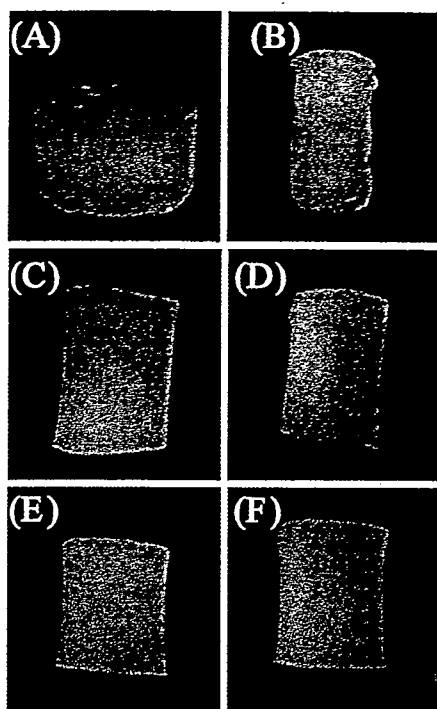


Fig. 1. Photographs of poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogels (A–D) and PVA/DNA (E,F) hydrogels at concentrations of A 3% w/v, B 4% w/v, C,E 5% w/v, and D,F 10% w/v obtained by ultra-high pressure treatment

tion (Fig. 1B–D). The PVA hydrogel of 4% w/v was fragile (Fig. 1B), but increasing the PVA concentration enhanced hydrogel formability, and hard hydrogels were obtained at a PVA concentration of 10% w/v (Fig. 1D). These results indicate that pressurization induced physical cross-linking of PVA molecules and that the degree of cross-linking increased as the PVA concentration increased. To investigate whether the PVA molecules were physically cross-linked by hydrogen bonding, a PVA solution of 5% w/v with urea (3.3M), which was used as a hydrogen bond inhibitor, was treated under the above pressurizing conditions. The solution remained translucent (data not shown), indicating that the PVA hydrogel obtained by pressurization was mediated by hydrogen bonding.

The gelation of mixed solutions of DNA and PVA (5% and 10% w/v) was achieved by pressurization in the conditions described above (Fig. 1E,F). To confirm the presence of DNA in the hydrogels obtained, they were heat treated at 90°C for 10min and then the DNA concentration of the solutions obtained was measured spectrophotometrically at 260nm. Roughly equal amounts of DNA were contained in each hydrogel (Fig. 2A). Also, when the hydrogels were immersed in nucleic acid dye solution, which interacts electrostatically with the phosphate groups of DNA, the PVA hydrogel with DNA was stained, whereas the PVA hydrogel without DNA was not (Fig. 2B). These results indicate that a PVA hydrogel that sustains DNA (PVA/DNA hydrogel) was formed on pressurization. On the other hand,

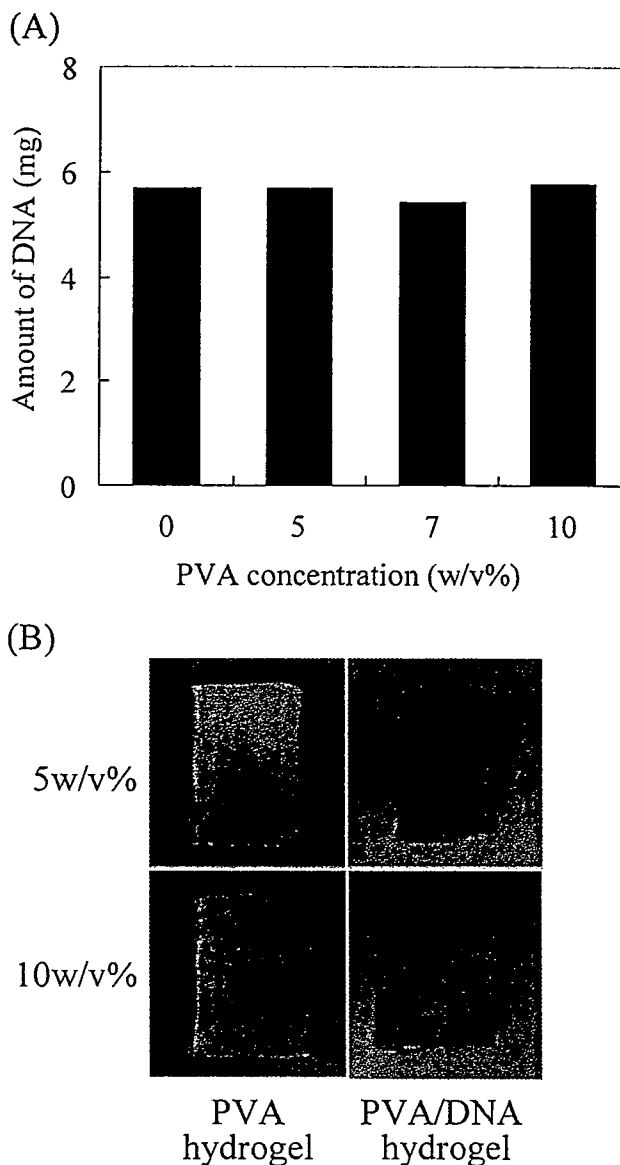
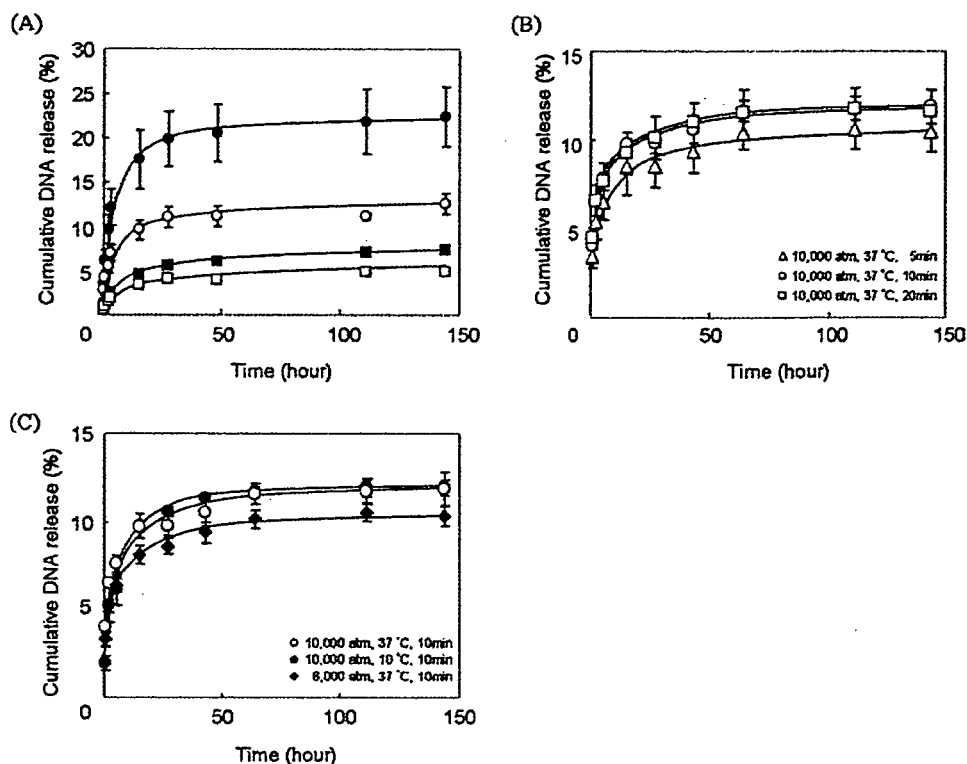


Fig. 2A,B. Presence of DNA in PVA/DNA hydrogels. A Amount of DNA in solution obtained by melting PVA/DNA hydrogels prepared using ultra-high pressure processing. B Photographs of PVA hydrogels and PVA/DNA hydrogels stained with nucleic acid dye

when urea was introduced, PVA/DNA hydrogel was not obtained on pressure treatment. This result suggests that hydrogen bonding between PVA and DNA took place in the pressurized PVA/DNA hydrogel.

DNA release from the PVA/DNA hydrogel formed by pressurization at 10000atm at 37°C for 10min was investigated. PVA/DNA hydrogels produced by the freeze-thaw method, a common method of forming PVA hydrogels,<sup>21</sup> were used as control samples. Figure 3A shows DNA release profiles from the PVA/DNA hydrogels at PVA concentrations of 5% and 10% w/v obtained by pressurization and the freeze-thaw method. Each release curve of DNA from a hydrogel consisted of a rapid phase in the initial 15h followed by a sustained release phase. However, the amount

**Fig. 3A–C.** DNA release test from PVA/DNA hydrogels produced by pressurization under various conditions or by the freeze–thaw method. **A** Release profiles of DNA from hydrogels at PVA concentrations of 5% w/v (○, ●) and 10% w/v (□, ■) PVA concentration. *Open* and *solid* symbols indicate DNA from hydrogels obtained by pressurization (at 10000 atm and 37°C, 10 min) and the freeze–thaw method, respectively. **B** Release profiles of DNA from hydrogels of 5% w/v obtained by pressurization at 10000 atm and 37°C for 5 min (□), 10 min (○), and 20 min (◻). **C** Release profiles of DNA from hydrogels of 5% w/v obtained by pressurization at 10000 atm and 37°C (○), 10000 atm and 10°C (●), and 8000 atm and 37°C (◻) for 10 min



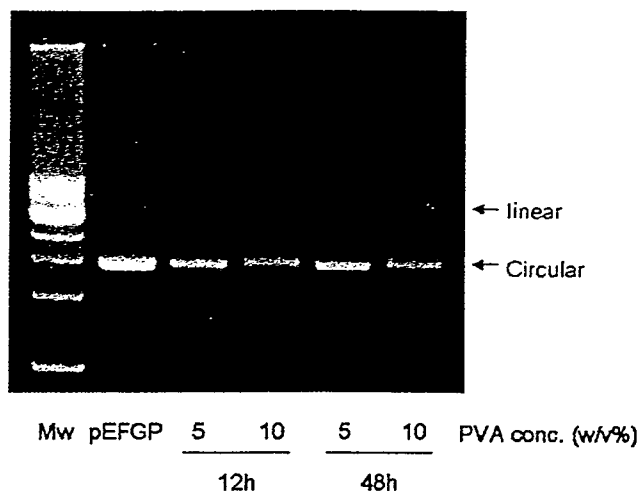
of DNA released was dependent on PVA content and on which procedure was used to prepare the hydrogels. The DNA release from the 10% w/v PVA/DNA hydrogels was lower than that from the 5% w/v PVA/DNA hydrogels, irrespective of the preparation methods. This is consistent with the fact that the 5% w/v samples were more easily stained by nucleic acid dye than the 10% w/v samples. We suppose that the increased crosslinking in the hydrogel caused by the increase in the PVA content contributed to the reduction of DNA released from the hydrogel. On the other hand, at the same PVA concentrations, DNA was more effectively released from the freeze–thaw hydrogels than from the pressurized hydrogels. Fibrous structures with large spaces (larger than 1  $\mu\text{m}$ ) were observed on SEM in the hydrogels made from 5% w/v PVA obtained by the freeze–thaw method, while many porous structures with diameters of 300  $\mu\text{m}$  were observed in the pressurized hydrogels (data not shown). We believe that this difference in internal structure between sample types affected the interaction of PVA and DNA, resulting in the larger release of DNA from the freeze–thaw hydrogels.

To investigate the influence of the pressure conditions used to form hydrogels on DNA release, PVA/DNA hydrogels of 5% w/v were prepared by different levels of pressurization at different temperatures and for different durations. First, with pressure processing periods varying from 5 to 20 min at 10000 atm and 37°C, similar DNA release profiles were exhibited for the hydrogels obtained at pressurizing times of 10 and 20 min, but the amount of DNA released by hydrogel samples pressurized for 5 min (Fig. 3B) was less than that released by samples with longer pres-

surizing times. Second, the DNA release curves of the PVA/DNA hydrogel produced on pressurization at 10000 atm and 10°C for 10 min were the same as those for hydrogels produced on pressurization at 10000 atm and 37°C for 10 min. However, less DNA was released by hydrogels produced at pressures of 8000 atm and 37°C for 10 min than by hydrogels produced at 10000 atm and 37°C for 10 min (Fig. 3C). These results indicate that DNA release from pressurized hydrogels is dependent on the level and duration of pressure used in the hydrogel formation process. We previously reported that PVA gelation was promoted by increasing the pressure and by prolonging the pressurization time, by which close hydrogen bonds between PVA molecules are formed.<sup>22</sup> It seems that DNA was easily released from PVA/DNA hydrogels pressurized under conditions of more than 10000 atm for longer than 10 min because the hydrogen bonding interaction between PVA and DNA was more unstable than that between PVA molecules under more intense pressure conditions.

It is important for DNA to be released from hydrogels without structural change or degradation.<sup>2,23</sup> Plasmid DNA (pDNA), which is generally used as the DNA delivered by a nonviral vector, was used instead of salmon sperm DNA. PVA/pDNA hydrogels at PVA concentrations of 5% and 10% w/v were obtained by pressurization at 10000 atm at 37°C for 10 min and then immersed in 5 ml PBS. After 12 and 48 h of immersion, the outer part of the solution was collected and analyzed by agarose gel electrophoresis at 100 V for 30 min to investigate the stability of released pDNA from the hydrogels (Fig. 4). No degradation of DNA was observed, indicating that the plasmid DNA released





**Fig. 4.** Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA (pDNA) released from PVA/pDNA hydrogels with PVA concentrations of 5% and 10% w/v produced by pressurization at 10000 atm and 37°C for 10 min after immersion in phosphate-buffered saline for 12 and 48 h

from the PVA/DNA hydrogels was stable. Two bands of linear and circular plasmid DNA were observed with 5% w/v PVA/DNA hydrogel, while circular plasmid DNA was released from the 10% w/v PVA/DNA hydrogel, indicating that the linear form of plasmid DNA tends to interact more strongly with PVA than the circular plasmid DNA.

## Conclusions

Novel PVA/DNA hydrogels crosslinked physically by hydrogen bonds were developed using UHP technology. DNA released from the hydrogels was controlled by varying the PVA concentration and pressurization conditions, such as the level and duration of pressure used to form the hydrogels. The demonstrated stability of the DNA released from the hydrogels suggests that PVA/DNA hydrogels have potential as a candidate for gene delivery.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, of Japan and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. We thank Kuraray, Co., Ltd., for supplying the poly(vinyl alcohol).

## References

- Nowak T, Nishida K, Shimoda S, Konno Y, Ichinose K, Sakakibara M, Shichiri M, Nakabayashi N, Ishihara K. Biocompatibility of MPC: in vivo evaluation for clinical application. *J Artif Organs* 2000;1:39–46
- Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet* 2005;6:299–310
- Zhang S, Xu Y, Wan B, Qiao W, Liu D, Li Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release* 2004;100:165–180
- Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Göpferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;60:247–266
- Dufes C, Uchegbu IF, Scatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:2117–2202
- Kimura T, Yamaoka T, Iwase R, Murakami A. Effect of physicochemical properties of polyplexes composed of chemically modified PL derivatives on transfection efficiency in vitro. *Macromol Biosci* 2002;2:437–446
- Futaki S. Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:547–558
- Reschel T, Koňák C, Oupický D, Seymour LW, Ulbrich K. Physical properties and in vitro transfection efficiency of gene delivery vectors based on complexes of DNA with synthetic polycations. *J Control Release* 2002;81:201–217
- Elouahabi A, Ruyschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther* 2005;1:336–347
- Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 2006;24:1121–1131
- Choksakulnimitr S, Matsuda S, Tokuda H, Takakura Y, Hashida M. In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems. *J Control Release* 1995;34:233–241
- Sakurai K, Mizu M, Shinkai S. Polysaccharide–polynucleotide complexes. 2. Complementary polynucleotide mimic behavior of the natural polysaccharide schizophyllan in the macromolecular complex with single-stranded RNA and DNA. *Biomacromolecules* 2001;2:641–650
- Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A. Novel PVA-DNA nonparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery. *Mater Sci Eng C* 2004;24:797–801
- Doi E, Shimizu A, Kitabatake N. Gel-sol transition of ovalbumin by high pressure. In: Hayashi R (ed) *High pressure bioscience and food science*. Kyoto: Sanei Press, 1993;171–177
- Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotech* 1999;17:551–554
- Chun KW, Lee JB, Kim SH, Rark TG. Controlled release of plasmid DNA from photo-cross-linked pluronic hydrogels. *Biomaterials* 2005;26:3319–3326
- Ochiya T, Takahama Y, Nagahara S, Sumita Y, Hisada A, Itoh H, Nagai Y, Terada M. New delivery system for plasmid DNA in vivo using atelocollagen as a carrier material: the Minipellet. *Nat Med* 1999;5:707–710
- Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y. Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *Biomaterials* 2005;26:3319–3326
- Kushibiki T, Tomoshige R, Fukunaka Y, Kakemi M, Tabata Y. In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. *J Control Release* 2003;90:207–216
- Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato K, Uchino Y, Kato M, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Collagen-immobilized poly (vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2006;76B:56–63
- Hyon SH, Cha WI, Ikada Y. Preparation of transparent poly (vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer Bull* 1989;22:119–122
- Yamamoto K, Furuzono T, Kishida A, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y. Formation of a supramolecular assembly of poly (vinyl alcohol) by ultrahigh pressure. Meeting Report of the Poval Committee 2002;121:25–26
- Walter E, Moelling K, Pavlovich HP. Microencapsulation of DNA using poly (D,L-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics. *J Control Release* 1999;61:361–374

# 繊維と線維(生体線維の洗浄と再生医療への展開)

Textile Fiber and Medical Fiber

澤田和也・寺田堂彦・藤里俊哉

## 1. はじめに

衣料用繊維素材は、植物や動物等の天然由来のものから、ナイロンやポリエステル等に代表される人工的なものまで、その種類が極めて多岐に渡っている。製造・加工技術の著しい進歩により、高機能化された繊維製品も多く登場し、我々の衣生活スタイルも大きく変化してきた。近年、繊維製品は工業・産業資材等にも広く応用化されていることは周知の通りであるが、それでも“繊維=衣料品”のイメージが強いことに変わりない。ここでは視点を少し変え、一般に殆ど認識されていない動物由来繊維の一種を紹介したい。動物由来繊維として連想できるものは、獣毛や絹糸等の体外で採取される蛋白質繊維であろう。しかし実際には、体内にも同様の線維が存在している。ここで、“繊維”と“線維”の単語を使い分けたが、その差に大きな意味はない。慣例的に、衣料分野では“繊維”が、医療分野では“線維”が用いられている。英語に訳せば何れも fiber であり、「細くて長いもの」という定義で本質的に同じである。さて、体内に存在する線維として、最も理解し易い例として血管を挙げる事が出来る。実際、繊維状の生体適合性高分子材料を用い、人工血管を造形することも多い。図1に血管の概略図を示した。血管組織を大雑把に見ると、遺伝情報を含む生物体の構成単位である細胞、それを支持して

いる細胞外マトリックスから成る。さらに、細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞接着性蛋白質と、コラーゲン及びエラスチンを主とする線維性蛋白質から構成されている。従って、血管組織から細胞や接着因子を除去すれば、最終的にはコラーゲン線維およびエラスチン線維が残ることになる。上述した生体内の線維とは、これらを意味しており、体の部位により組成は異なるが、脊椎動物の身体の構造要素の主体である。ここで紹介させて頂く線維のテーマは、これら生体内線維を再生医療で応用しようとする研究例である。

## 2. 研究背景

我々の体内に疾病組織が生じた場合、その回復を図る手段として最も望ましいことは、自己治癒により組織そのものを治癒化させることである。しかし、欠損もしくは機能不全に陥った組織に対しては、代替物との置換、つまり“移植”という手段も適応される。筆者らの研究チームが対象とする組織は心臓弁であるが、これについても同様である。現在、心臓弁置換の代替物には、パイロライト製の機械弁を用いるのが主である。最近では、一生の使用に耐え得る強度を有する製品も開発されている。しかし、これらの機械弁にも多くの問題が含まれている。例えば、生涯にわたる抗血栓剤の服用は、安全性や経済面において問題が残る。

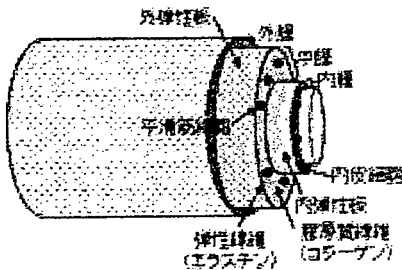


図1 血管構造の概略図



DOHIKO TERADA

大阪工業大学 工学部 博士研究員  
博士(工学)

〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1  
〈専門〉高分子材料加工  
〈趣味〉読書



KAZUYA SAWADA  
大阪成蹊短期大学 総合生活学科  
准教授 博士(工学)  
〒533-0007 大阪市東淀川区相川3-10-62  
Tel: 06-6829-2561 Fax: 06-6829-2579  
E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp  
〈専門〉繊維加工、染色化学、コロイド化学  
〈趣味〉スキー、旅行



TOSHIYA FUJISATO

大阪工業大学 工学部 教授 工学博士  
〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1  
Tel: 06-6954-4746  
E-mail: fujisato@bme.oit.ac.jp  
〈専門〉再生医工学、組織工学  
〈趣味〉旅行計画

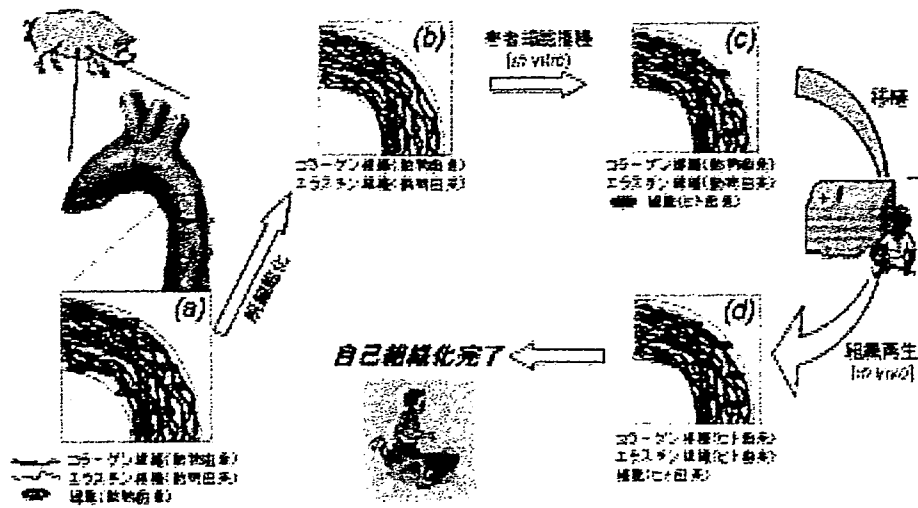


図2 下行大動脈をモデルとした生体線維による再生医療

また、サイズが永久に不変なため、小児患者では成長と共に再手術が避けられない。一方、ヒトから提供される心臓弁であれば、機能面では好都合である。しかし、ドナーの絶対的な不足は今後も解消の見込みが無い。そこで近年、置換代替物として動物由来の心臓弁を利用するという、両者の中間に位置する検討が進められている。図2は、それらの概念図であり、簡略のため心臓弁ではなく下行大動脈をモデルとして示した(a)。欠損した組織を医療用動物由来のものと置換するが、その際に動物由来細胞を除去(脱細胞)し、移植の足場となる線維組織のみの構造体(スキャフォールド)を作成する(b)。次に、患者から採取した細胞を生体外にてスキャフォールドへ播種・培養させる(c)。この際、細胞のスキャフォールドに対する親和性・接着性を高めるため、必要に応じスキャフォールドに対し表面加工を行う。この過程においては繊維表面加工の技術が活かされている。その後、外科的にスキャフォールドの移植を行うが、患者自身の細胞を含む組織であるので、拒絶反応は大幅に低減される。一方、スキャフォールドである線維組織そのものは、異種由来であることから、移植後長年をかけて徐々に分解され、替わりにヒト由来の線維組織が再生する(d)。最終的には患者自身の組織で置換され自己組

織化が完了する。

この概念では、血管はもちろん、心臓弁や気管など多くの組織に適応可能なことから応用性が高い。さらに、極めて複雑な構造の生体組織を造形する必要が無い。一方、異種由来組織を用いる場合、前記のように免疫反応を無くするためにドナー由来細胞を除去し、線維組織のみにすることが必須となる。換言すれば、摘出組織から細胞という不純物を洗浄除去することになる。興味深いことに、この操作は、衣類の洗浄と同様、界面活性剤による洗浄が一般的である。本稿では血管組織を例として、洗浄により細胞を洗い流し、スキャフォールドを得るための手段について、筆者らの研究成果も交えて紹介する。

### 3. 生体線維の洗浄手法

#### — 界面活性剤/酵素併用による洗浄法 —

この手法は、現在最も一般的に行われる手法であり、図3にその概略を示した。界面活性剤水溶液による洗浄効果を高めるため、ビルダーとして酵素を添加する場合もあり、衣料の洗浄と原理は全く同じである。ただ、使用される界面活性剤はSDSやTritonX-100が主であり、最適洗浄効果を考えた界面活性剤のスクリーニングは皆無に近い。また、

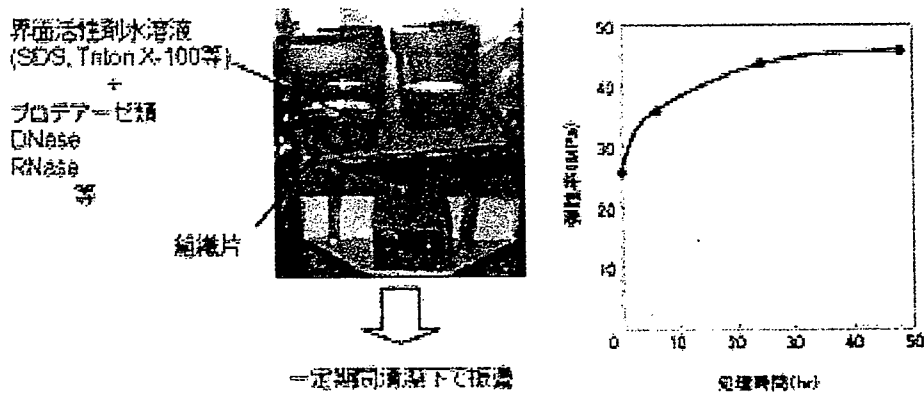


図3 界面活性剤による脱細胞化 (左: 洗浄手法 右: 処理前後の力学特性変化)

酵素には線維組織を加水分解し、細胞を除去し易くするため、プロテアーゼを用いることもある。しかし、これも実際にはトリプシンやキモトリプシンの利用が通例であり、それ以上の工夫は殆どない。衣料洗浄と異なる点は、DNAやRNAの分解を目的として、DNaseやRNaseを添加するケースがあることである。この様な洗浄により、組織中の細胞が洗い流され、最終的にコラーゲン線維やエラスチン線維のみが維持される。この手法では、一連の操作に要する時間がおよそ数日間とされる。これは、界面活性剤除去(すすぎ洗い)のための十分な時間も必要なためであり、この点においては衣料の洗浄と大きく異なる。しかしながら、十分な“すすぎ洗い”をしたとしても、線維に吸着した界面活性剤の全量を除去することは困難である。さらに、これらの界面活性剤は何れも細胞毒性を示すことから、僅かな組織内残存も好ましくない。また、同図右に示すように、界面活性剤処理により線維組織の力学特性が変化することも知られている。さらに、強度維持のためアルデヒドを用いた架橋処理が施されるのが通例であるが、生体吸収性の低下や後述する石灰化との関連が指摘されている。これらを総合的に考えると、同法による脱細胞化では、強度や毒性などの生体への安全性問題が残っていると結論せざるを得ない。現在、これらの欠点を補うため、電離活性線照射の併用等、種々の工夫も試みられている。

次に紹介する例は、これに替わる新たな手法として著者らの研究チームが開発している例である。

#### 4. 超高静水圧印加法

界面活性剤による洗浄は、細胞を洗い流すという観点において大変優れた手法である。しかし、線維組織の硬化や、界面活性剤の残存が大きな問題である。そこで、その欠点を克服する手段として、超高静水圧印加処理を考案した。これは、試料に対しおよそ10000気圧を等方的に10分間印加し、その後緩衝溶液下で洗浄するものである(図4上段)。この操作では、超高圧印加により細胞が破壊され、その後の水溶液洗浄で容易に細胞除去が可能になる。化学薬剤を用いない物理的手法であり、毒性面における生体へ

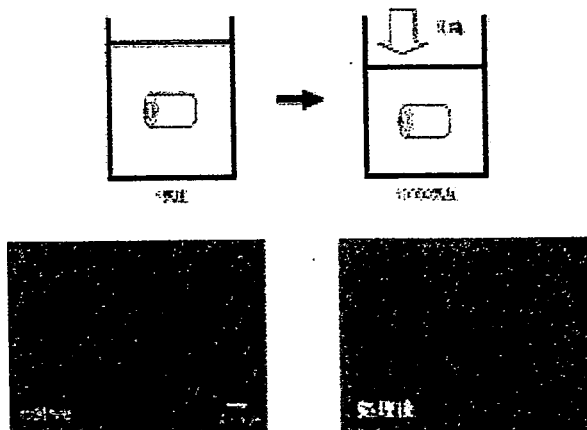


図4 超高圧印加処理と脱細胞化評価

の安全性が極めて高い。図4下段は同法で洗浄を行った結果であり、Hematoxylin-Eosin(HE)染色を行った写真である。尚、本稿における組織染色写真は、全て血管の断面部である。同写真左において native の血管では粒状に細胞が染色されているのに対し、処理後の写真では染色されておらず、効果的に脱細胞が行われている。また、コラーゲンやエラスチンの線維組織はそのまま維持されていることもわかる。又、内在性レトロウイルス(PERV)の残存もPCR法で評価を行ったが、それらが不活化されたことも確認している。次に、除去が困難とされる細胞膜リン脂質の残存を評価した結果を図5に示した。リン脂質は、移植後の石灰化の要因の一つとして問題視される物質であり、細胞除去の際に併せて評価すべき要因の一つである。図5上段の定量分析結果によると、超高圧印加処理のみではリン脂質が除去されていない。下段のTEM観察結果も同様の結果を示している。濃い黒に写っている部分がリン脂質であり、細胞膜及び核膜部分に集中している。本法は界面活性剤を用いない点で優れているが、逆に疎水性の高いリン脂質を単純に除去しにくいことも示している。しかし、この問題は比較的容易に解決可能であり、施圧後にアルコール浸漬することにより除去可能になる。同図の定量分析結果からも明らかな様に、殆どのリン脂質がアルコール処理により除去されている。しかし、極めて僅かな残存も確認される。TEM観察の結果では、核膜に起因するリン脂質の一部が残存している。極めて僅かな残存が生体にどのような影響を与えるかについては現段階では不明であるが、現在大動物を用いた長期移植経過観察中であり、今後の検討項目になるであろう。

#### 5. 超臨界流体抽出法

超高圧印加法は、物理的手法であり界面活性剤処理やアルデヒド処理を含む工程に比べ、高い安全性が確保できる有効な手段である。しかし、リン脂質除去のために多段階工程が必要なこと、そして長期間(約3週間)の処理が必要という点で問題が残る。そこで、これらを改善する手法として研究を進めているのが、超臨界流体抽出法である。超

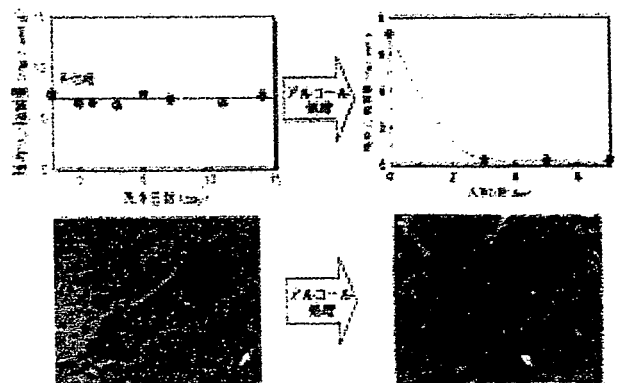


図5 脱細胞処理血管のリン脂質量変化 (上段: 定量分析結果 下段: TEM 観察結果)