

A112 電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御

Control of myotube contraction by electrical pulse

○学 山崎健一（阪工大院），林宏行（阪工大院），小林裕之（阪工大院），
宇戸慎仁（阪工大院），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）

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

Hiroyuki HAYASHI, 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

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: Bio-actuator, C2C12 cell, Contraction, Electrical pulse, Chronaxie

1. 緒言

生体筋は軽量かつ小型で、出力対重量比が大きいアクチュエータである⁽¹⁾。現在、種々の材料を用いた人工筋の開発が進められているが、このような生体筋の特性を得るには至っていない。そこで、生体筋そのものをアクチュエータ（バイオアクチュエータ）として利用することが考えられる。しかし、バイオアクチュエータとして、生体筋を用いると多くの動物を犠牲にする必要があるため、細胞から作製した培養筋を利用することが望ましい。このためには、培養筋の収縮弛緩を何らかの方法によって制御する必要がある。これまで、電気パルスによって筋管細胞の収縮弛緩を制御する試み⁽²⁾が報告されているが、筋管細胞の収縮動態の定量評価や刺激条件の詳細な検討はなされていない。そこで本研究では、培養筋の収縮弛緩を制御するための刺激条件について検討し、収縮動態を定量的に評価することを目的とした。

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細胞を直径60 mmのコラーゲンコートディッシュに細胞密度 1.0×10^4 cells/cm²で播種した。培養液には10%ウシ胎児血清（FBS），抗生物質を含むHigh-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium（HG-DMEM）を用いた。4日間培養した後、筋管細胞の形成を促進させるため、培養液を7%馬血清、抗生物質を含むHG-DMEMに変更した。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形態の変化を観察した。培養は37℃，5%CO₂，湿度100%の環境下で行った。

2-2. 筋管細胞収縮の周波数特性

パルス電圧に対する筋管細胞の周波数応答性を調べた。図1に実験システムの概略図を示す。培養10日後に白金平板電極をディッシュの端部に設置した。Waveform generatorから培養液中にパルス電圧を印加した。電界の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。パルス幅を20 msecとし、入力電圧を10 Vp-pから30 Vp-p、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動態変化をコンピュータに取り込んだ。取り込んだ動画をフレーム毎の静止画に分割し、グレースケール（0-255）に変換した。収縮弛緩する筋管細胞の輪郭周囲を任意に選択し、その領域の平均値を求めた。さらに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. クロナキシー測定

培養10日目の細胞に周波数を1 Hzとして、入力電圧およびパルス幅を変化させ、筋管細胞が収縮するときの値を調べた。ディッシュと直列に100 Ωの抵抗を挿入し、その両端の電圧を測定することにより回路を流れる電流を算出した。筋管細胞が収縮し始めるときの電流とパルス幅との関係（Strength-Duration curve）をグラフに示し、基電流とクロナキシーを求めた。すべての電気刺激実験は37℃，大気中でおこなった。また、周囲溶液には10%FBS，抗生物質，25 mM HEPESを含むHG-DMEMを使用した。

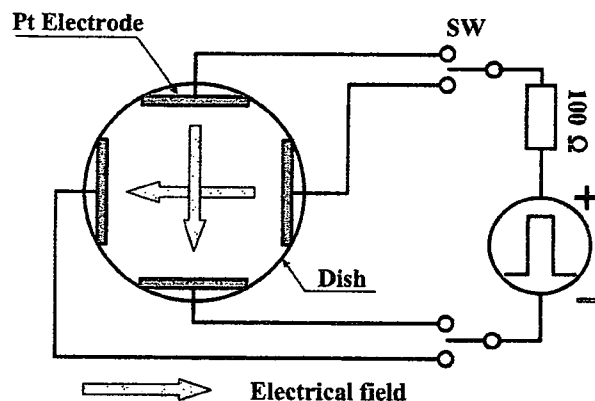


Fig.1 Schematic drawing of experimental system.

3. 結果

培養4日目に細胞がコンフルエントに達し、培養6日目には筋管細胞に変化している様子が見られた。また、培養8日目に自己拍動する細胞が見られた。図1に細胞播種2時間後および10日後のC2C12細胞の位相差顕微鏡画像を示した。単核の細胞が融合し、細長い筋管細胞に変化していた。

図2(a)に入力電圧10 Vp-p、パルス幅20 msec、周波数1 Hzのときの筋管細胞の収縮動態をグレースケールに変換した結果を示した。Parallelでは周期的にグレースケールの値が変化しているが、Verticalではそのような傾向が見られなかった。図2(b)にグレースケールをフーリエ変換した結果を示した。Parallelでは1 Hzに強い周波数スペクトルのピークが見られるが、Verticalでは見られなかった。

入力電圧30 Vp-pにおいて、周波数0.5 Hzから2 Hzまで周波数に同期してParallelの筋管細胞が収縮弛緩した。3 Hz

および 5 Hz では電気パルスに同期する細胞も見られたが、その数は 2 Hz 以下に比べて少なかった。10 Hz では電圧入力時に細胞の収縮が見られたが、同期は見られなかった。

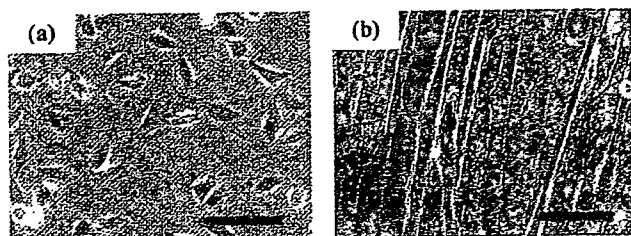


Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells at 2 hours (a) and at 10 days (b). Bar=100 μ m

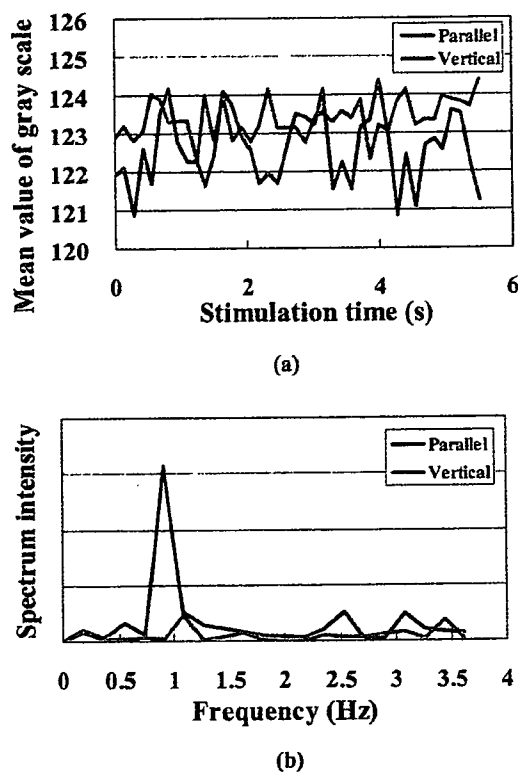


Fig.3 Results of image analysis of C2C12 contraction with electrical pulse at 10 days. (a) Mean value of gray scale, (b) Frequency spectrum.

図 3 に Strength-Duration curve を示した。本実験では、パルス幅 500 msec のときの電流を基電流とし、基電流の 2 倍の値のときのパルス幅をクロナキシーと定義した。Parallel および Vertical の基電流はそれぞれ 10.2 mA および 15.8 mA であった。また、Parallel および Vertical のクロナキシーはそれぞれ 2.2 msec および 7.1 msec であった。

4. 考察

本実験において、C2C12 細胞の収縮弛緩は 0.5 Hz から 2 Hz まで電気パルスと同期し、3 Hz 以上では同期する細胞数が少なかった。ここには示していないが、10 Hz のときの C2C12 細胞の収縮弛緩を画像解析したところ、電気パルス入力時にグレースケールの平均値が高くなり、刺激を続け

ている間はほとんど一定の値を示していた。このことから、同期しなかった細胞は、強縮が生じていたと考えられる。

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⁽³⁾。電界方向が細胞の伸展方向に対して平行方向のとき、垂直方向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、筋管細胞と平行に電界を生じさせることで、少ないエネルギーで収縮弛緩させることが可能であることを示している。しかし、このような異方性が生じる原理について示すにはデータが少なく、今後さらに検討していく必要がある。一般に、骨格筋のクロナキシーは 0.1 msec から 0.3 msec ほどであり、本研究の値とは大きく異なる。本実験では、Strength-Duration 曲線に用いた電流は回路中を流れる電流であり、細胞に流れる電流ではない。そのため、骨格筋との比較は難しいが、このような測定系の違い、細胞の分化の段階、2 次元培養であったことなどが原因として考えられる。

このように、培養筋の収縮弛緩を制御するには入力する信号の大きさ、周波数およびパルス幅だけでなく、電界方向にも依存することがわかった。今後、C2C12 細胞を 3 次元培養し、培養筋のアクチュエータ化についてさらに検討していく予定である。

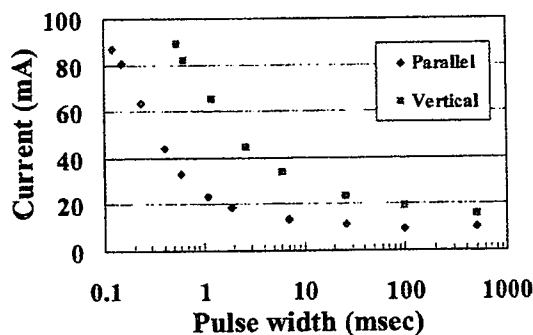


Fig.4 Strength-Duration curve.

5. 結論

本実験より以下の結論を得た。

1. 周波数により筋管細胞の収縮弛緩の動態が変化することが定量的に示された。
2. 筋管細胞には電界に対する異方性があり、筋管細胞に対して平行に電界をかけることで、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でき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」の助成より行われた。

参考文献

- (1) 星宮望, 赤澤堅造, 筋運動制御系, 昭晃堂, (1993)
- (2) 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
- (3) 宮島智, 岡久雄, 筋の振動特性とクロナキシー自動計測システムの開発, 信学技報, MBE2000-40, (2000) 9-16.

G-079 CONTROL OF SKELETAL MUSCLE CELL CONTRACTION BY
ELECTRICAL PULSE

¹⁾Dept. Biomedical Eng. Osaka Institute of Tech., Osaka, Japan,
²⁾Dept. Electrical and Electronic systems Eng. Osaka Institute of Tech., Osaka, Japan, ³⁾Dept. regenerative Medicine and Tissue Eng. National Cardiovascular Center, Suita, Japan

K. Yamasaki¹⁾, H. Hayashi¹⁾, S. Uto²⁾, T. Ehashi³⁾, S. Hashimoto¹⁾, H. Tsutsui¹⁾, S. Mochizuki¹⁾, H. Kondo¹⁾, M. Yoshiura¹⁾, T. Fujisato¹⁾

Background: Contractility of the tissue-engineered muscle with electrical signal has been required for the development of bio-actuator and muscle tissue regeneration. Although some investigators have already reported about the contraction of myotubes with electrical pulse, the strategy to improve their contractility has not been established. In this study, we discussed about the effect of variety of pulse stimulation on the contraction of skeletal muscle cells.

Method: The C2C12 cells were seeded on various treated substrates and cultured in the Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum. When the C2C12 cells reached confluence, the medium was changed to the DMEM containing 2% horse serum to allow them to differentiate to the C2C12 myotubes. Electrical stimulation was performed to the C2C12 myotubes and their contraction was observed under the phase contrast microscope at 37°C. The variations were made on amplitude, pulse duration, and frequency of voltage of 0 V-30 V, 0 msec-100 msec, and 0.05 Hz-10 Hz, respectively.

Result: The C2C12 myotubes contracted on collagen coated substrate at voltage up to 10 V at pulse duration up to 3 msec, and at frequency between 0.05 Hz to 4 Hz. The number of contracting tubes increased as frequency decreased. The motion of C2C12 myotube contraction depended especially on the pulse duration and frequency.

Conclusion: It is indicated that parameters of pulse duration and frequency of electrical stimulation are important for the control of myotube contraction.

P08 無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養

○山崎 健一、寺田 堂彦、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】生体筋は出力対重量比が大きいアクチュエータである。現在、このような特性を有するアクチュエータは存在しないことから、培養筋をバイオアクチュエータとして利用することが考えられる。そこで本研究では、機械的強度があり、形状の制御が比較的容易な脱細胞化した生体由来組織を、C2C12細胞のスキヤフォールドとして3次元培養し、バイオアクチュエータとしての機能を評価した。【方法】熱架橋によって固定化処理を施したブタ大動脈をTris-Bufferで希釈したエラストマーゼ中に浸漬し、大動脈からエラスチンを分解除去した。続けてアルコール処理によって細胞膜成分であるリン脂質の抽出除去を行い、脱細胞スキヤフォールドを作製した。得られたスキヤフォールドに、C2C12細胞を 1.0×10^6 cells/mlの濃度で $100\mu\text{l}$ 播種した。1時間静置後に10%FBS、抗生物質を含むHigh-glucose DMEMを加えて5日間培養した。5日後に10%FBSを7%HSへと変更してスキヤフォールドに接着したC2C12細胞の融合を促進させた。培養9日目に培養液中に電気パルスを印加し、培養筋の動態変化を位相差顕微鏡で観察するとともに、HE染色を行って断面の様子を観察した。【結果】入力電圧10 Vp-p、周波数1 Hz、パルス幅20 msecのパルス電圧に同期して培養筋が収縮弛緩した。周波数を10 Hzにすると強縮が生じた。HE染色の結果、細胞はスキヤフォールドの表面に多く接着しており、ほとんど内部には侵入していなかった。これらのことから、スキヤフォールド表面に細胞が接着するだけで、培養筋が収縮弛緩し、さらに強縮することがわかった。今後、スキヤフォールド内部に細胞を侵入させることで、高出力なバイオアクチュエータを創生することが可能となると考えられる。【結論】無細胞生体由来組織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。

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 (国立循環器病セ), 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⁽¹⁾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 1.0×10^4 cells/cm² 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) を用い, 37°C, CO₂ 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_{pp}, 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⁽²⁾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。

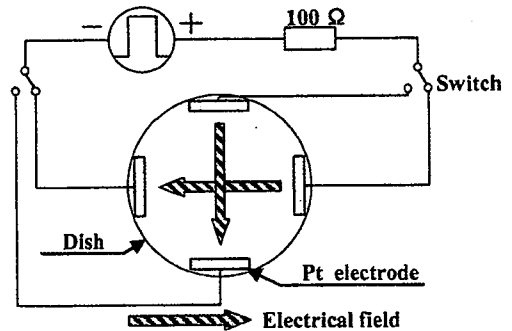


Fig.1 Schematic drawing of experimental system

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。

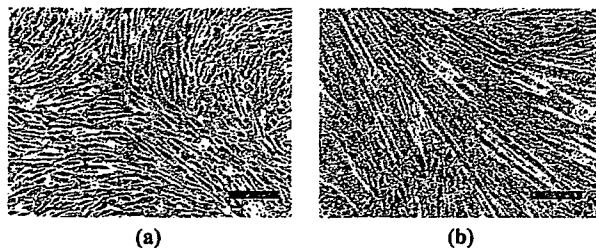


Fig.2 Phase-contrast images of C2C12 cells.

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

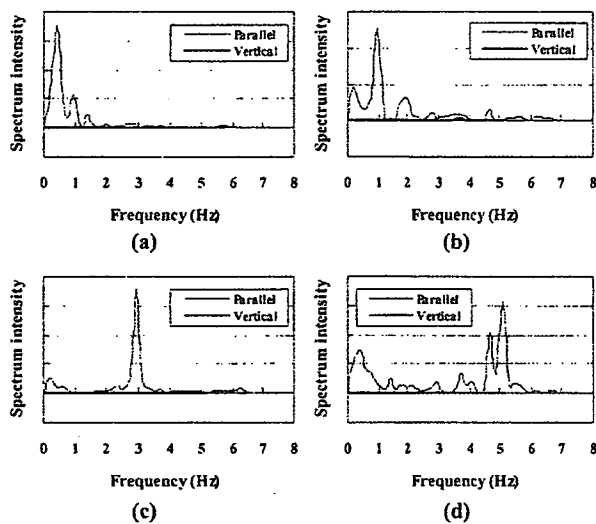


Fig.3 Results of Fourier transform.

(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⁽²⁾。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。

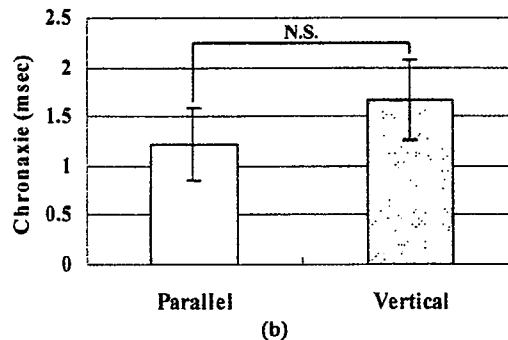
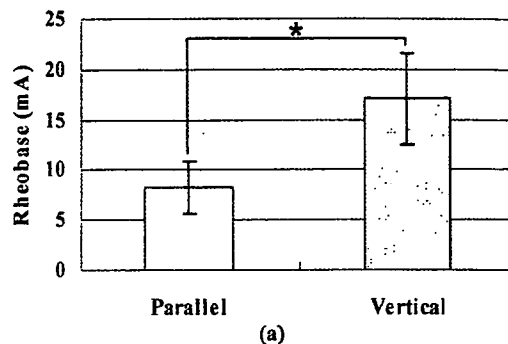


Fig.4 Results of Rheobase and Chronaxie.

(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^{1,2}, 澤田 和也², 緒方 裕之¹, 平工 香織¹, 鎌田和加子¹, 吉田 謙一¹, 船本 誠一², 藤里 俊哉¹, 岸田 晶夫³, 山岡 哲二³, 中谷 武嗣³

¹大阪工業大学工学部生体医工学科, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³大阪成蹊短期大学, ⁴国立循環器病センター, ⁵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（ジャパンファーム）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/トリス緩衝溶液（0.57 μg/ml; CaCl₂ 10 mM; NaN₃ 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化および石灰化は認められず、無数のレシピ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ヶ月でエラスチン線維の再形成は認められなかった。弾性線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¹, 山崎 健一¹, 寺田 堂彦^{1,2}, 澤田 和也³, 近藤 英雄¹, 橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹

¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²ヒューマンサイエンス振興財団, ³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¹, 山崎 健一¹, 小林 裕之¹, 宇戸 禎仁²,
近藤 英雄¹, 橋本 成広¹, 藤里 俊哉¹

¹大阪工業大学大学院工学研究科生体医工学専攻, ²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。現在は、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。同波数を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) バリデ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^{1,3}, 柿木佐知朗¹, 江橋 具², 森反 俊幸³, 山岡 哲二¹

¹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,

²国立循環器病センター研究所再生医療部, ³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 μ 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*¹, Kazuo Niwaya², Kenji Minatoya², Akio Kishida⁵, Takeshi Nakatani³, and Soichiro Kitamura⁴

¹Regenerative Medicine & Tissue Engineering, ²Cardiovascular Surgery, ³Organ Transplantation

⁴National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

⁵Biofunctional 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).

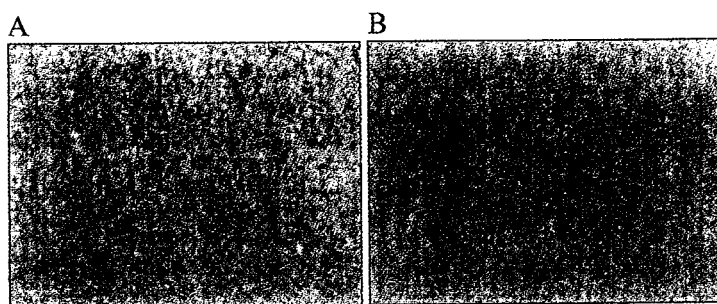


Fig. 2 Cross sections of (A) native and (B) treated tissues (H-E staining).

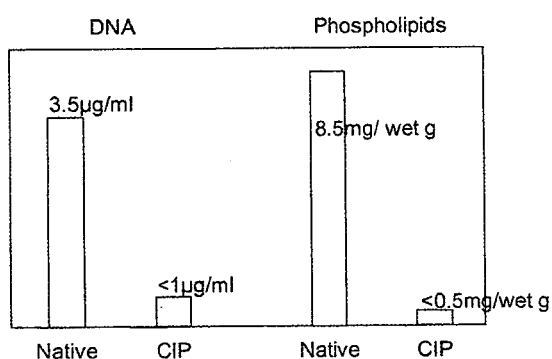


Fig. 3 Residual amounts of DNA and phospholipids in native and treated tissues.

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 Clawn 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).

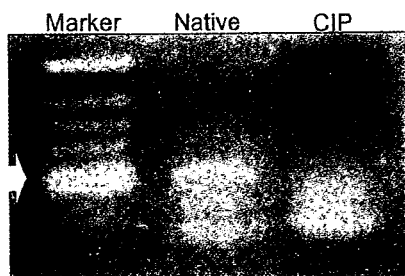


Fig. 4 PCR products of PERV (arrow) in native and treated tissues.

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.

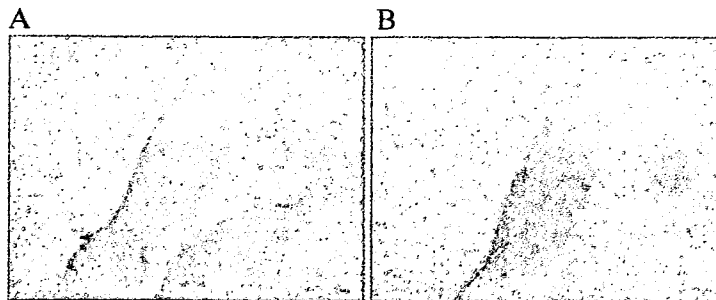


Fig. 5 Cross sections of (A) anti-vWF (endothelial cells) and (B) anti- α SMA (smooth muscle cells) immunostained treated tissues 24 weeks after the transplantation.

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.¹ In gene therapy, nonviral synthetic gene carriers have been the focus of attention due to their biological safety advantages over viruses.² In many cases, cationic synthetic materials, such as cationic lipids, liposomes,³ polyethyleneimine,⁴ polyamideamine dendrimer,⁵ poly-L-lysine (PLL), PLL derivatives,⁶ and other cationic peptides,⁷ 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.^{8,9} However, the cytotoxicity of cationic materials was reported to be a significant problem.^{10,11} 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 (β -1,3 glucan), was formed through hydrogen bonding.¹² 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 (980MPa) and 40°C for 10 min.¹³ It is well known that intra- and intermolecular hydrogen bonding increases in these conditions.¹⁴ 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),¹⁵ hyaluronic acid,¹⁶ atelocollagen,¹⁷ and gelatin.^{18,19} 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*.¹⁵ 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.^{18,19} 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.²⁰ 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.²¹

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-

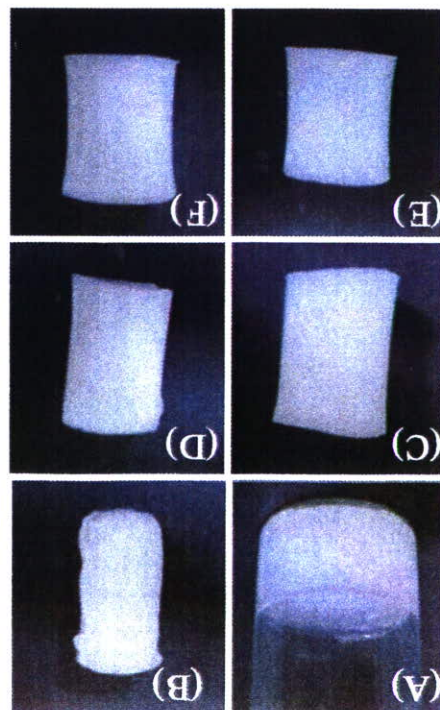


Fig. 1. Photographs of poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogels (A-D) and PVA/DNA (E,F) hydrogels at concentrations of A, 3% w/v; B, 4% w/v; C, E, 5% w/v; and D, F, 10% w/v obtained by ultra-high pressure treatment

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 10 min and then the DNA concentration of the solutions obtained was measured spectrophotometrically at 260 nm. 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, DNA release from the PVA/DNA hydrogel formed by pressurization at 1000 atm at 37°C for 10 min was investigated. PVA/DNA hydrogels produced by the freeze-thaw method, a common method of forming PVA hydrogels,²¹ 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 15 h followed by a sustained release phase. However, the amount

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

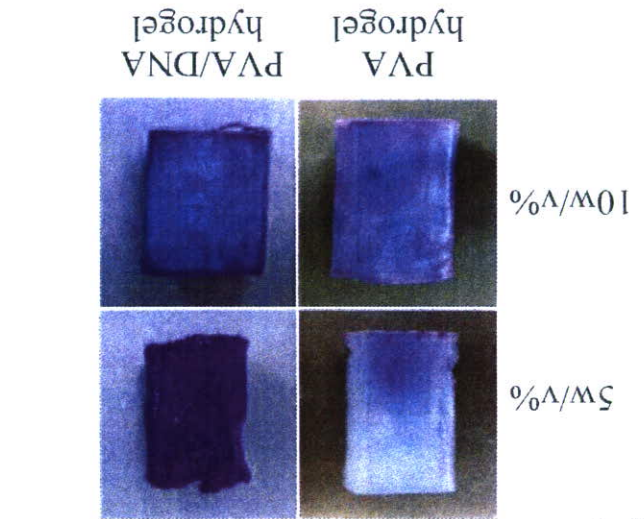
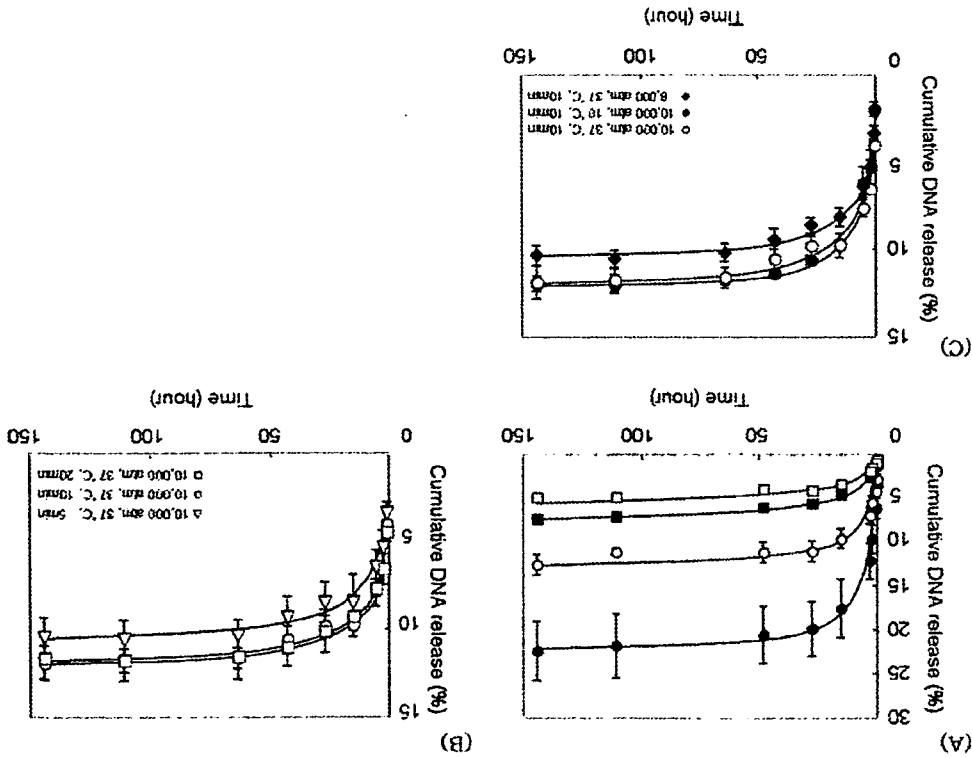


Fig. 3A-C. DNA release test from PVA/DNA hydrogels produced by pressurization under various conditions or by the freeze-thaw method. A Release profiles of DNA from hydrogels at PVA concentrations of 5% w/v (●) and 10% w/v (■) (○, □) and PVA concentration. *Open* and *solid* symbols indicate DNA from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

It is important for DNA to be released from hydrogels without structural change or degradation.^{22,23} Plasmid DNA (pDNA), which is generally used as the DNA delivered by a nonviral vector, was used instead of salmon sperm DNA. PVA/DNA hydrogels at PVA concentrations of 5% and 10% w/v were obtained by pressurization at 10000 atm 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