

たとえられるが、コラーゲン繊維配向の乱れが示されていることから、更なる浸漬時間の延長は困難であると考えられる。コラーゲン繊維配向の乱れは、SDSによるGAG溶解によって誘起されていると考えられ、血管、弁等の組織に比べ高いGAG含有率の角膜組織の脱細胞化においてはSDSの利用は不適であると考えられる。

一方、タンパク質（生体組織）変性を誘起しない非イオン性界面活性剤であるTriton X-100では、コラーゲン繊維へのダメージは少ないものの、繊維間距離の拡大し、脱細胞化もほとんどなされなかった。Triton X-100による脱細胞化処理では、用いる組織により脱細胞化効率が異なることが報告されており、何らかの角膜特性が脱細胞化に影響したと考えられる。これらの結果より、角膜の脱細胞化においては、界面活性剤のみでの利用は不適であると言える。

次に、我々が開発した超高压処理法による角膜の脱細胞化について検討を行った。超高压処理法は、超高压印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する方法である。脱細胞化への印加圧力の影響を調べるため4000、10000気圧にて高压印加を施した。高压処理後、1日間洗浄した角膜を図3 (B)、(C)に示す。4000気圧の圧力印加では半透明の角膜が得られ、10000気圧の超高压印加により、白濁角膜が得られた。また、H-E染色所見では、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった(図4 (B)、(C))。これらの結果は、超高压処理法による脱細胞化の有用性を示している。しかしながら、いずれの場合も、上記の界面活性剤法に比べて低いものの、処理による角膜の膨潤がみられ、未処理角膜の約3倍の膜厚であった。この膨潤により角膜透過性が減少しているものと考えられ、角膜機能の一つである透過性を獲得するためには解決すべき問題である。そこで、デキストランを添加することで角膜の膨潤抑制を試みた。その結果、超高压処理、洗浄操作後の膜厚は約1.5倍の増加に留まり、デキストラン添加による十分な膜厚抑制が示された。

生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により約70%の膨潤度に調節され、透明性が維持されていることが知られている。従って、超高压脱細胞化により高度に膨潤した角膜が、脱水によ

り収縮し、透明性が回復することができれば、移植人工角膜としての応用可能性が示唆される。そこで、脱水モデル実験として、超高压処理により得られた脱細胞化角膜を高張液であるグリセロールに浸漬し、透明性の回復について検討した。浸透圧による強制的脱水である。50%、100%グリセロール溶液に1時間浸漬された結果を図3に示す。50%グリセロールにて半透明に透明性が回復し、100%グリセロールでほぼ透明になった。また、脱水角膜の透過率を測定した結果、約60%の透過率を示した。これらの結果は、得られた超高压脱細胞化角膜の移植時における透明性回復の可能性を示している。さらに、超高压脱細胞化角膜の力学的物性を圧縮試験により検討した。脱細胞化角膜は、未処理角膜に比して若干の弾性率の低下が認められたが、グリセロール浸漬後の脱細胞化角膜では、未処理角膜とほぼ同程度の弾性率を示した。以上の結果により、超高压脱細胞化角膜の人工角膜としての応用可能性が示された。

脱細胞化率を定量的に評価するため、脱細胞化処理後の角膜に残存するDNAとGAGの定量を行った(図5)。界面活性剤による脱細胞化角膜では、残存DNA量が減少した。一方、超高压処理による脱細胞化角膜では、検出限界の残存DNA量であり、完全な細胞除去が示された。また、抽出DNAのアガロースゲル電気泳動を行った結果、超高压処理角膜ではDNAは検出されなかった(data not shown)。GAGについては、TritonX-100、SDSおよび30°C/UHPによる脱細胞化角膜では、未処理に比べ、残存GAG量が減少した。一方、10°C/UHPによる脱細胞化角膜では、残存GAG量に変化は認められなかった。

脱細胞化処理によるコラーゲン線維の微細構造変化を評価するために、電子顕微鏡による観察を行った。未処理角膜は均一に配向したコラーゲン線維が観察された(Fig. 6A)。界面活性剤による脱細胞化角膜はコラーゲン線維の配向の乱れが顕著であった(Fig. 6B C)。一方、超高压処理による脱細胞化角膜では、コラーゲン線維の配向は維持されていたが、未処理に比べ若干の繊維間の拡大が観察された(Fig. 6D, E)。

脱細胞化角膜の透明性を評価した。界面活性剤、超高压による脱細胞化処理により透過率は著しく低下した。角膜は、内皮細胞のNa⁺-K⁺ポンプ

機能により浸透圧が調節され、透明性を維持している。ポンプ機能モデルとしてグリセロールによる浸透圧の調節を行った結果、透明性の回復が認められた(図7)。それぞれの透過率は30°C/UHP: 79±3.8%、10°C/UHP: 62±5.0%となり、未処理と同程度に回復した。TritonX-100: 28±3.3%、SDS: 13±1.8%であり、回復は認められなかった。

D. 考察

本研究では、移植用角膜への応用を目指した脱細胞化角膜を開発し、特性を評価した。脱細胞化角膜は、生体角膜に類似した構造を有しており、かつ、ドナー細胞を完全に除去することにより免疫反応の惹起を抑制することが可能であり、問題解決のアプローチの一つであると考えられる。

一般的な脱細胞化法である界面活性剤を用いて角膜の脱細胞化を試みた。界面活性剤法では、完全な細胞除去は成されず、残渣が観察された。浸漬時間が短いため脱細胞化が不十分であったと考えられるが、膨潤に伴うコラーゲン線維間隙の拡大や配向の乱れおよび断片化が観察されたことから、更なる浸漬時間の延長は困難であると考えられる。角膜の透明性はI型およびV型コラーゲン線維が高密度に配列し、かつ、角膜内皮細胞のNa⁺-K⁺ポンプによって含水率が約78%に保持されることによって維持されている。従って、角膜実質において不可逆的な構造変化が生じた場合、角膜は混濁し、透明には戻らない。界面活性剤による脱細胞化角膜をグリセロールにて浸透圧の調節を行ったが、透明性は回復しなかった。これは、GAG-コラーゲン相互作用が破壊およびタンパク質の変性により、不可逆的な構造変化が生じたため考えられる。以上より、角膜の脱細胞化において界面活性剤法は不適であると考えられる。

一方、超高压処理法では、完全な細胞の除去が示され、コラーゲン線維配向の大きな乱れは認められなかった。一般には、高压印加によりタンパク質の変性が生じることが知られているが、超高压処理による白濁が生じた。我々は、超高压処理による角膜の白濁はコラーゲン線維の変性によるものではなく、角膜内皮細胞のポンプ機能破壊による膨潤に起因すると考えた。グリセロールによる浸透圧の調節を行った結果、透明性の回復が認められたことから、変性による不可逆的な構造変化は生じていないことが示された。

以上より、超高压処理による脱細胞化角膜の人工角膜としての応用可能性が示された。

E. 結論

超高压処理により完全な細胞除去と生体角膜に類似した力学特性と微細構造を有する脱細胞化角膜の開発に成功した。また、グリセロールへの浸漬により超高压脱細胞化角膜の透明性が回復したことから、角膜内皮細胞によるポンプ機能により透明性が回復する可能性が示めされた。以上より、脱細胞化角膜の移植用角膜組織としての有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam K, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A. Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery. *J Artif Organs* 2007; 10: 104-8.
- 2) Nam K, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials* 2007; 28: 3153-62.
- 3) Kimura T, Funamoto S, Kishida A. Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization. *Control Rel Soc Newslet* 2007; 24(2): 10-1.
- 4) Nam K, Kimura T, Kishida A. Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents. *Macromol Biosci* 2008; 8: 32-7.
- 5) 木村 剛、船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、望月 學、岸田晶夫、小林尚俊. 脱細胞化角膜の特性とin vivo生体適合性評価. 東京医科歯科大学生体材料工学研究所年報 2008; 41: 15-7.

2. 学会発表

- 1) Nam K, Murakoshi A, Kimura T, Fujisato T,

- Kishida A. Cross-linking and polymer immobilization of decellularized blood vessel for bioscaffold application. Transactions of the 32nd Annual Meeting of Society for Biomaterials 2007; 817.
- 2) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki Y, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods. TERMIS-NA 2007 Abstract CD.
 - 3) Ito Y, Kimura T, Higami T, Fujisato T, Kato A, Masuzawa T, Kishida A. Cell Culture on Nano-Vibrating Surface for Controlling Cell Function. Tissue Eng 2007; 13(7): 1648-9.
 - 4) Kimura T, Okada M, Furuzono T, Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A. Cellular Delivery of DNA-Polymer Complex Encapsulating Inorganic Nanoparticles Prepared by Ultra High Pressurization. Tissue Eng 2007; 13(7): 1652.
 - 5) Murakoshi A, Kimura T, Funamoto S, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kishida A. Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue Using Ultra High Hydrostatic Pressurization. Tissue Eng 2007; 13(7): 1680.
 - 6) Kobayashi H, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kishida A. Implantation of porcine cornea decellularized by ultra high pressurization to rabbit cornea. Tissue Eng 2007; 13(7): 1709-10.
 - 7) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Preparation and characterization of cornea decellularized by ultra high pressurization. Tissue Eng 2007; 13(7): 1746-7.
 - 8) 船本誠一、橋本良秀、佐々木秀次、南 広祐、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 超高圧処理技術を応用した人工角膜の作製と評価. 第15回生物関連高圧研究会 20周年記念シンポジウム要旨集 2007; P-1.
 - 9) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Acellular porcine cornea via ultra-high pressurization as a scaffold for regeneration of cornea. J Artif Organs 2007; 36(2): S-86.
 - 10) 船本誠一、橋本良秀、南 広祐、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 組織工学的的手法による人工角膜の開発. 第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2007; 126.
 - 11) Kimura T, Horiuchi K, Kurata K, Ono T, Yoshizawa H, Furuzono T, Nam KW, Fujisato T, Kishida A. Preparation of Condensal Plasmid DNA Using High Pressure Technology for Gene Delivery. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract 2007; 138.
 - 12) Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Nam KW, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Characterization of acellular porcine cornea by ultra-high pressurization as artificial cornea. TERMIS-AP 2007 Program & Abstract 2007; 149.
 - 13) Saitoh Y, Katanoda M, Yamada H, Fujisato T, Kimura T, Kishida A, Takakuda K. Reconstruction of small diameter arteries using acellular vessel scaffold. 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract 2007; 250.
 - 14) Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kimura T, Fujisato T, Kobayashi H, Kishida A. Development of Acellular Cornea as an Artificial Cornea. 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract 2007; 263.
 - 15) Kimura T, Horiuchi K, Kurita K, Ono T, Yoshizawa H, Fujisato T, Kishida A. DNA condensation using hydrostatic pressurization for gene delivery. 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract 2007; 302.
 - 16) Kishida A, Kimura T, Funamoto S, Hashimoto Y, Sasaki S, Mochizuki M, Kobayashi H, Fujisato T. Preparation and Characterization of Decellularized Porcine Cornea for the Corneal Tissue Engineering. Biologic Scaffold for Regenerative Medicine, 5th Symposium 2008; 63.

- 17) 橋本良秀、船本誠一、佐々木秀次、望月 學、藤里俊哉、木村 剛、小林尚俊、岸田晶夫. 脱細胞化角膜の組織適合性評価. 日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 260.
- 18) 村越彩子、木村 剛、船本誠一、藤里俊哉、岸田晶夫. 力学特性の制御を目指した脱細胞化血管の調製. 日本再生医療学会雑誌 2008; 7(Suppl): 280.

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

- 1) 岸田晶夫、藤里俊哉、木村 剛、船本誠一. 脱細胞処理液、脱細胞化組織の調製方法、移植片、及び培養部材. 特許出願2007-217099、2007年8月23日.
- 2) 岸田晶夫、木村 剛、南 広祐、藤里俊哉. 機能性DNAの製造方法、形質転換体及び疾患治療剤. 特許出願2007-263704、2007年10月9日.

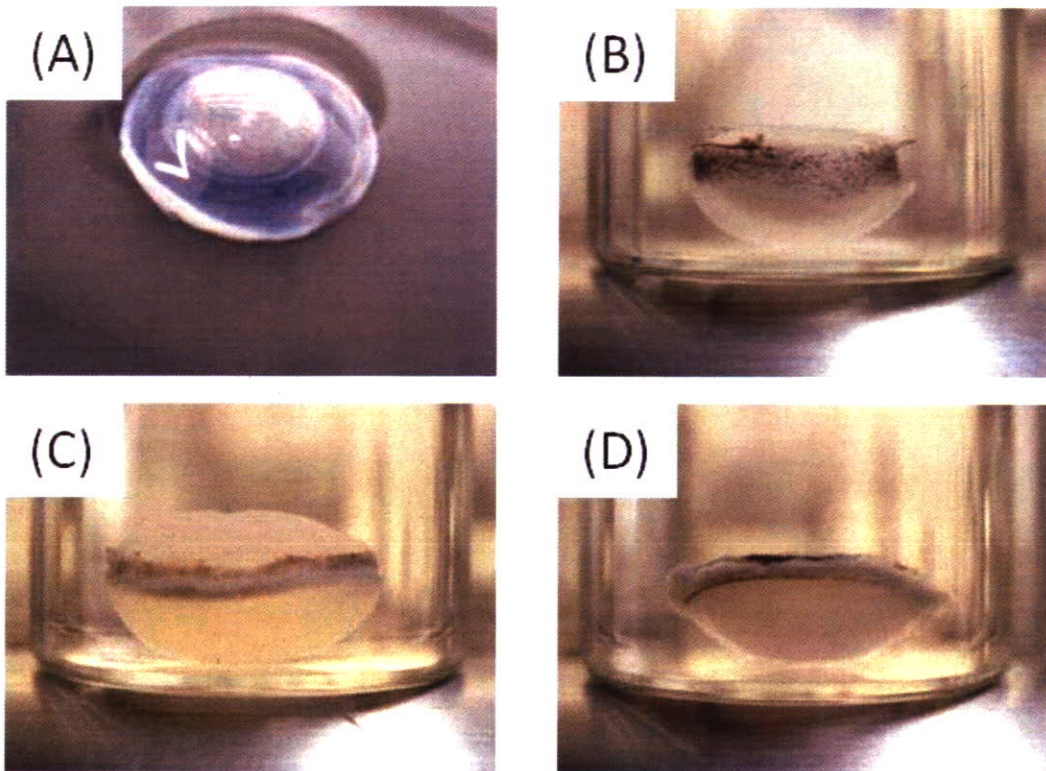


図1. 化学的処理法にてブタ角膜を脱細胞化処理した写真
 (A) 未処理, (B) SDS, (C) Triton X-100, (D) コール酸ナトリウム

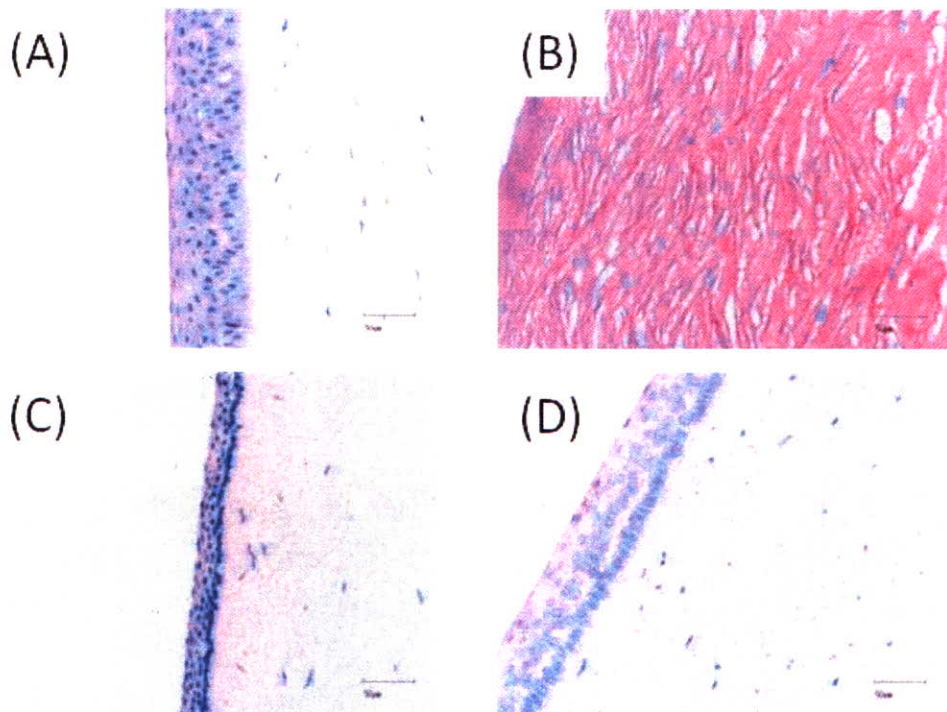


図2. 化学的処理法により脱細胞化したブタ角膜のH-E染色
 (A) 未処理, (B) SDS, (C) Triton X-100, (D) コール酸ナトリウム

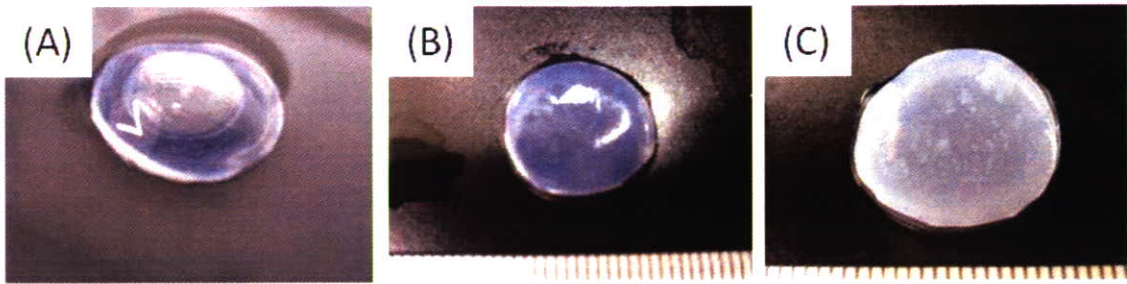


図3. 超高压処理法にてブタ角膜を脱細胞化処理した写真
 (A) 未処理, (B) 4000気圧, (C) 10,000気圧

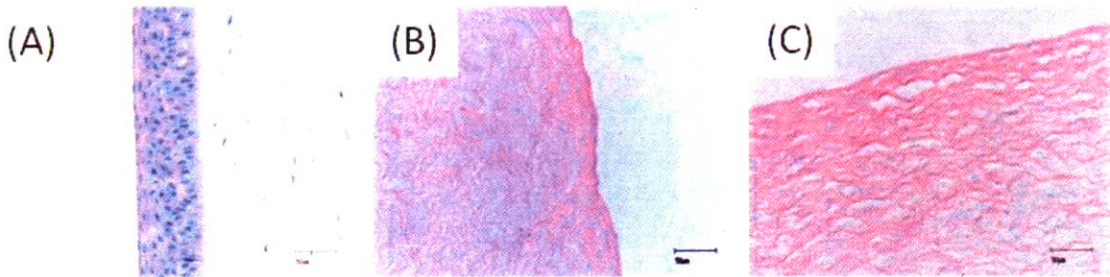


図4. 超高压処理法により脱細胞化したブタ角膜のH-E染色
 (A) 未処理, (B) 4000気圧, (C) 10,000気圧

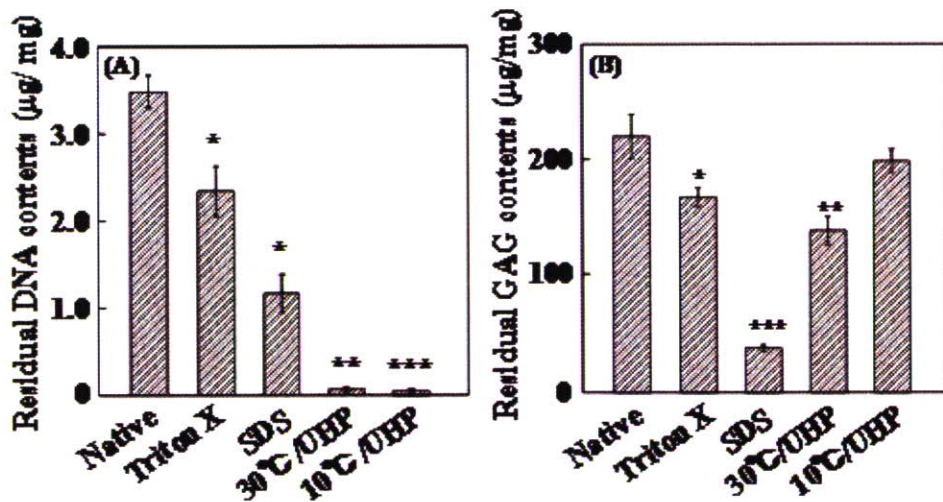


図5. 各手法により脱細胞化したブタ角膜の (A) DNA定量、(B) GAG定量

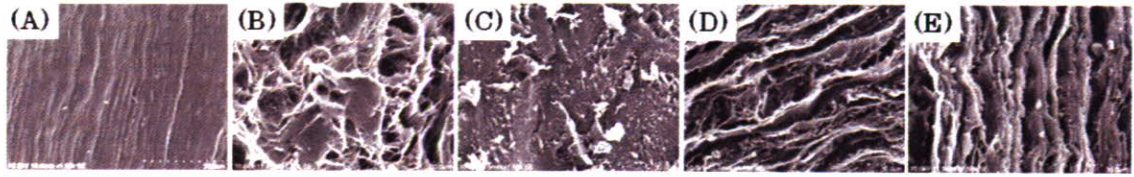


図6. 各手法により脱細胞化処理したブタ角膜のSEM像
 (A)未処理, (B) SDS, (C) Triton X-100, (D) 4000気圧, (E) 10,000気圧

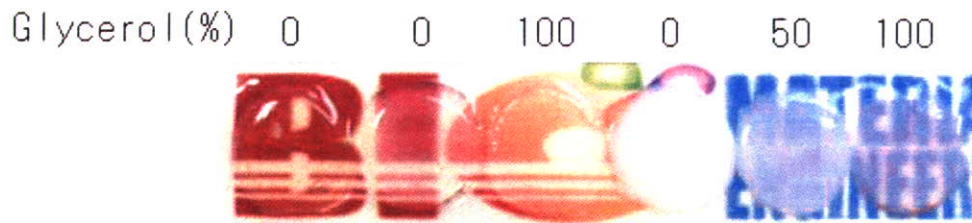


図7. グリセロールによる透明性回復試験

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

	著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1	藤里俊哉、 北村惣一郎	心臓弁	筏 義人	再生医療工学の技術	シーエム シー出版	東京	2007	279 (142-7)

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Kimura T, Iwai S, Moritan T, Nam K, Mutsuo S, Yoshizawa H, Okada M, Furuzono T, Fujisato T, Kishida A	Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery	J Artif Organs	10	104-8	2007
2	Nam K, Kimura T, Kishida A	Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels	Biomaterials	28	3153-6 2	2007
3	Kimura T, Funamoto S, Kishida A	Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization	Control Rel Soc Newslet	24(2)	10-1	2007
4	Nam K, Kimura T, Kishida A	Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents	Macromol Biosci	8	32-7	2007
5	木村 剛、船本誠一、 橋本良秀、佐々木秀次、 望月 學、岸田晶夫、 小林尚俊	脱細胞化角膜の特性とin vivo 生体適合性評価	東京医科歯科大学 生体材料工学 研究所年報	41	15-7	2008
6	Fujisato T, Niwaya K, Minatoya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S	Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing	High Press Biosci Biotech	1(1)	161-5	2007
7	澤田和也、寺田堂彦、 藤里俊哉	繊維と線維（生体繊維の洗浄 と再生医療への展開）	繊維と工業	63(5)	120-4	2007

学会発表

	演者	演題名	学会名	場所	開催年月日
1	Nam K	Cross-linking and polymer immobilization of decellularized blood vessel for bioscaffold application	米国バイオマテリアル学会2007年度年次大会	シカゴ (米)	2007年4月18~21日
2	Fujisato T	Regenerative Tissue Scaffolds Prepared by Gamma Ray Irradiation	同上		
3	江橋 具	脱細胞化筋スキヤフォールドを用いた骨髄由来間葉系幹細胞の筋分化誘導	第46回日本生体医工学会	仙台	2007年4月25~27日
4	寺田堂彦	生体内で自己組織化するバイオ人工血管の開発	同上		
5	寺田堂彦	生体内で再細胞化する無細胞バイオ人工血管の開発	第56回高分子学会年次大会	京都	2007年5月29~31日
6	Kobayashi H	Preparation of decellularized cornea by chemical and physical methods	国際組織工学会北米支部2007年度年次大会	トロント (加)	2007年6月13~16日
7	Terada D	Development of the vascular graft having an in situ repopulationity	同上		
8	Ehashi T	Effect of stretch culture of mesenchymal stem cells on their differentiation into skeletal muscle cells	同上		
9	Fujisato T	Regenerative vascular graft for aortic root reconstruction in porcine model	国際心臓弁膜症学会第4回大会	ニューヨーク (米)	2007年6月15~18日
10	寺田堂彦	移植用生体弁の力学評価	平成19年度繊維学会年次大会	東京	2007年6月20~22日
11	藤里俊哉	放射線照射による脱細胞バイオスキヤフォールドの調製	第2回高崎量子応用研究シンポジウム	高崎	2007年6月21~22日
12	藤里俊哉	再生型組織移植用の脱細胞化スキヤフォールドの開発	第6回日本組織移植学会	豊中	2007年8月4日
13	Ito Y	Cell Culture on Nano-Vibrating Surface for Controlling Cell Function	国際組織工学会欧州支部2007年度年次大会	ロンドン (英)	2007年9月4~7日
14	Kimura T	Cellular Delivery of DNA-Polymer Complex Encapsulating Inorganic Nanoparticles Prepared by Ultra High Pressurization	同上		
15	Terada D	Development of the Regenerative Vascular Graft having in In vivo Repopulationity	同上		
16	Murakoshi A	Effect of the Pressurizing Process on the Decellularized Aortic Tissue Using Ultra High Hydrostatic Pressurization	同上		
17	Kobayashi H	Implantation of porcine cornea decellularized by ultra high pressurization to rabbit cornea	同上		
18	Ehashi T	Novel cell seeding method for the tissue-derived acellular scaffolds	同上		
19	Miskon A	Preliminary Study of In Vitro Niche Effect on Differentiation of Rat Bone Marrow Stem Cell to Cardiomyocytes-Like Cells	同上		

	演者	演題名	学会名	場所	開催年月日
20	Kimura T	Preparation and characterization of cornea decellularized by ultra high pressurization	同上		
21	船本誠一	超高圧処理技術を応用した人工角膜の作製と評価	第15回生物関連高圧研究会20周年記念シンポジウム	横浜	2007年9月6～7日
22	寺田堂彦	再生型生体弁の特性評価	日本機械学会2007年度年次大会	吹田	2007年9月9～12日
23	大西優貴	筋芽細胞の分化と細胞膜電位の変化	生体医工学シンポジウム2007	札幌	2007年9月21～22日
24	林 宏行	電気パルスによる骨格筋細胞収縮の制御	第5回生活支援工学系学会連合大会	つくば	2007年10月1～3日
25	山崎健一	電気パルスを用いた筋管細胞の収縮制御	第18回バイオフロンティア講演会	福岡	2007年10月6～7日
26	近藤英雄	電気インピーダンス法を用いた骨格筋の評価	同上		
27	Fujisato T	Tissue Regeneration by Acellular Scaffolds by Detergent-Free Treatment	第2回国際人工臓器学会・第45回日本人工臓器学会	大阪	2007年10月28～31日
28	Yamasaki K	Control of skeletal muscle cell contraction by electrical pulse	同上		
29	Kimura T	Acellular porcine cornea via ultra-high pressurization as a scaffold for regeneration of cornea	同上		
30	Ehashi T	Novel Method for Interspersed Cell Inoculation into the Tissue-derived Scaffold	同上		
31	山崎健一	無細胞生体由来組織を用いた筋芽細胞の3次元培養	第10回日本組織工学会	東京	2007年11月8～9日
32	船本誠一	組織工学的手法による人工角膜の開発	第29回日本バイオマテリアル学会大会	豊中	2007年11月26～27日
33	近藤英雄	生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の基礎的検討	同上		
34	佐々木 愛	高親水性高分子を用いた人工血管用スキャフォールドの作製と評価	同上		
35	奈良雅尚	ポリプロピレン繊維を用いた筋芽細胞の三次元培養	同上		
36	西垣戸麻美	超高静水圧印加処理による脱細胞神経グラフトの作製	同上		
37	Fujisato T	Tissue-derived Scaffold for Aortic Root Reconstruction	国際組織工学会アジア太平洋支部2007年度年次大会	東京	2007年12月3～5日
38	Kimura T	Preparation of Condensal Plasmid DNA Using High Pressure Technology for Gene Delivery	同上		
39	Kimura T	Kitamura S, Kobayashi H, Kishida A. Characterization of acellular porcine cornea by ultra-high pressurization as artificial cornea	同上		
40	Fujisato T	Evaluation of Acellular Scaffolds for Heart Valve Regeneration	第1回アジアバイオマテリアル学会	つくば	2007年12月6～8日
41	Saitoh Y	Reconstruction of small diameter arteries using acellular vessel scaffold	同上		

	演者	演題名	学会名	場所	開催年月日
42	Funamoto S	Development of Acellular Cornea as an Artificial Cornea	同上		
43	Ehashi T	Acellular Skeletal Muscle Scaffold as an Inducer of Muscular Differentiation	同上		
44	Kimura T	DNA condensation using hydrostatic pressurization for gene delivery	同上		
45	近藤英雄	電気インピーダンス法による骨格筋損傷度の評価の試み	第20回バイオエンジニアリング講演会	東京	2008年1月25～26日
46	林 宏行	培養筋管細胞の収縮動態の定量評価	同上		
47	山崎健一	無細胞生体由来組織を基材としたバイオアクチュエータの開発	同上		
48	Fujisato T	Tissue Regeneration by Decellularized Biological Scaffold Prepared by Detergent-free Treatment	第5回再生医療用生物スキャフォールドシンポジウム	フェニックス(米)	2008年2月14～18日
49	Kishida A	Preparation and Characterization of Decellularized Porcine Corenea for the Corneal Tissue Engineering	同上		
50	藤里俊哉	異種組織をテンプレートとする組織再生技術の開発	第11回日本異種移植研究会	吹田	2008年2月23日
51	藤里俊哉	生体由来素材スキャフォールドを用いた臓組織再生	第36回人工心臓と補助循環懇話会	湯沢	2008年3月7～8日
52	橋本良秀	脱細胞化角膜の組織適合性評価	第7回日本再生医療学会総会	名古屋	2008年3月13～14日
53	村越彩子	力学特性の制御を目指した脱細胞化血管の調製	同上		
54	寺田堂彦	脱エラスチン化血管組織をスキャフォールドとして用いた動脈組織再生	同上		
55	玉井克明	血管組織の新規脱細胞化処理法の検討	同上		
56	北 孝之	電気インピーダンス法を用いた培養筋成熟度の評価の試み	同上		
57	奈良雅尚	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	同上		
58	山崎健一	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	同上		
59	赤土和也	骨格筋培養のための機械刺激負荷装置の開発	同上		
60	林 宏行	電界に対する培養筋管細胞の異方性	同上		
61	西山慶子	細胞への電気刺激を目的とした電位分布の測定	同上		
62	近藤英雄	生体高分子ゲルを用いた電気インピーダンス法の検討	同上		

特許

	発明者	名称	出願人	番号	年月日
1	岸田晶夫、 藤里俊哉、 木村 剛、 船本誠一	脱細胞処理液、脱細胞化組織の調製方法、移植片、及び培養部材	東京医科歯科大学 大阪工業大学	特許出願 2007-217099	2007年 8月23日
2	岸田晶夫、 木村 剛、 南 広祐、 藤里俊哉	機能性DNAの製造方法、形質転換体及び疾患治療剤	東京医科歯科大学 大阪工業大学	特許出願 2007-263704	2007年 10月9日
3	藤里俊哉、 岸田晶夫、 船本誠一、 中谷武嗣、 北村惣一郎	超高静水圧印加による移植用生体組織の処理方法	国立循環器病センター	特許 第4092397号	2008年 3月14日

報道等

	タイトル	媒体	年月日
1	他人の頭皮で毛髪再生	朝日新聞	2008年2月1日
2	他人の頭皮で毛髪再生	アサヒコム	2008年2月1日

書籍 1

再生医療工学の技術

監修 ◆ 笹 義人

Biotechnology
regenerative
medicine

再生医療工学

再生医療工学の技術

監修 ◆ 笹 義人



9784882319375



1923047038005

ISBN978-4-88231-937-5
C3047 ¥3800E

定価(本体3,800円+税)(B0830)

OMO

通常は60歳以上の高齢者への適用とされる。また、DSE問題をきっかけに、ウシ心臓の使用は控えられる傾向にある。

欧米では1985年頃から、我が国でも、近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことにより、死体から提供された凍結保存同種心臓が臨床で使用されつつある。これは、機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして両者に対して抗感染性で優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者では比較的早期に機能不全をきたす症例も報告されており、免疫反応の関与が強く示唆されている。若年者に有効とされる Ross 手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存同種弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存同種弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が少なくない。以上のように、再生医心臓弁に求められる特性として、抗凝固性、耐久性、成長性などが挙げられよう。

4.3 再生医心臓弁の世界的動向

マサチューセッツ工科大学の Langer や Vacanti らによって提唱された組織工学の手法は、すでに米国で細胞を組み込んだ人工皮膚として製品化されている。同様の手法を用いた再生医心臓弁が、1995年以降、彼らのグループから報告されている¹⁾。新聞にはヒツジを用いた実験で、末梢血管網の細切によって血管内皮細胞、平滑筋細胞、および線維芽細胞を分離した後に8-10週間培養し、ポリグリコロール複製のシート状メッシュ上にまず線維芽細胞と平滑筋細胞を、続けて1週間後に血管内皮細胞を移植することによって、再生医心臓弁を形成した。ヒツジの肺動脈弁の一葉を再生医心臓弁葉で置換したところ、6週後には正常組織と同様の組織が再生し、9週以降は力学特性も正常組織と同等であったと報告している²⁾。最近、彼らは弁葉だけでなく、三葉を有するバルサルバル付きの心臓弁組織 scaffold を開発し、細胞を移植することで *in vitro* で弁全体を組織工学的に作成し、臨床応用を開始する計画である。このような生体吸収性 scaffold を用いた再生医心臓弁は、韓国ソウル大学などからも報告されている³⁾。

一方、米国の CryoLife 社は1992年から米国内閣の補助を受けて動物組織から細胞を除去した異種組織移植法の研究開発に取り組み、詳細を明らかにしていないが、SynerGraft と称する細胞除去方法を発表している。同社は1999年から脱細胞化ブタ大動脈弁の臨床使用を開始し、2001年には世界初の再生医心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数ヶ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告している⁴⁾。

ドイツ・ハノーバー医科大学の Haverich らのグループは、1998年から CryoLife 社と同様に異種生体弁から動物由来細胞を除去し、さらにレジンビエントの自己血管内皮細胞を移植している。

藤里俊哉¹⁾、北村惣一郎²⁾

4 心臓弁

4.1 はじめに

日本人工臓器学会の調査によると、我が国で心臓弁疾患によって置換術を受けた患者は大動脈弁と僧帽弁が合わせて1999年において年間8千人以上にのぼり、80%が機械弁、残り20%が異種生体弁である。また、米国胸外科学会の調査によると、大動脈弁置換術は1997年において年間約9千人であり、判明しているものうち約50%が機械弁、45%が異種生体弁、3%が同種弁、残り約1千人である。術前診断や術中の体外循環技術の向上などもあり、大動脈弁置換術における死亡率は1998年において約4%とされている。このように、最も臨床的に使用される人工臓器の一つとして確立した感のある心臓弁置換術ではあるが、現在、どのような問題があり、これを解決するために再生医心臓弁にはどのような特性が要求されるのであろうか。まず、心臓弁置換術の現状について述べた後、現在、開発されつつある再生医心臓弁の動向、そしてその将来展望について述べる。

4.2 心臓弁置換術の現状

現在用いられている機械弁は、主にバイロフトカーボン製の2枚の半月状弁葉をもった二葉弁である。従来、弁葉部分の構造上の問題から弁閉後の止較差が無視できない大きさで、心機能や予後に影響を与えたとされてきたが、最近、弁葉部分の改良によって有効弁口面積を広くしたものが開発され、弁輪が狭小の症例においても通常の弁置換術で対応可能である。また、独特の弁葉弁動音を減少させたものも開発されている。機械弁はすでに十分な耐久性と血行動態を得ているが、依然として抗血栓性の問題は解決されていない。抗凝固のため、術後は生涯にわたって重なりワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症をきたす頻度も高くなる。また、ワーファリンが脆弱性を有することから、妊娠を希望する若年女性には使用できないという問題もある。

異種生体弁は、ブタ心臓弁あるいはウシ心臓弁を免疫原性の低下のためにグルタルアルデヒドで固定化したものである。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされてきたが、近年、後述の同種弁の成功をきっかけにステントを用いないスデントレトレス異種生体弁が導入され、耐久性の向上が期待されている。異種生体弁は抗凝固性に優れているが、若年者では5-10年程度の耐久性は乏しく、

* 1 Toshia Fujisato 国立循環器病センター研究所 再生医心臓部 研究員

* 2 Soichiro Kitamura 国立循環器病センター 総長

彼らは界面活性剤である Triton X-100 やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている⁹⁾。一方、英国リーズ大学の Ingham らのグループは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDS が最も細胞除去に適していると報告している¹⁰⁾。また、ドイツ・フンボルト大学の Komertz らのグループはセツジを用いた6ヶ月間の動物実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を播種すると、弁の変形も石灰化も見られなかったと報告しており¹¹⁾、臨床使用を開始している。

4.4 我々の最新成果の紹介

我々は2000年から、Haverich らの方法を対照として、脱細胞化した英種生体弁を用いた再生医療研究を開始した。我々が生体組織を選んだのは、以前から凍結保存用種々の臨床使用に取組んできたことと、心臓弁のような複雑な形状を吸水性人工材料で造形することが容易でないこと、およびポリ乳酸などの生体吸水性人工材料は生体よりも硬いために生体と同等の力学特性をもたせるのが難しいと考えたためである。ミニブタあるいは食用ブタ肺動脈弁を採取し、Triton X-100 溶液に浸漬して脱細胞化処理した。脱細胞化処理による生体力学特性への影響は力学試験機で測定した。ミニブタの大動脈から静脈処理によって採取した自己内皮細胞を2週間培養槽後に播種し、2日後に右心バイパス下にて肺動脈弁置換術を施行した。心エコーと圧測定による血行動態測定後に移植弁組織を摘出し、免疫染色などによって組織学的所見を検討した。

24時間の無細胞化処理によって表面から1mm以内の組織内細胞を除去できた(図1)。組織表面の血管内皮細胞は破壊されていたが、完全に脱落することはなく、他の物理的方法の併用が必要であった(図2)。また、Triton X-100 は細胞毒性を示すため、組織から除去して細胞を播種するためには2週間以上の洗浄を要した。脱細胞化処理によって強度、弾性率ともに2倍固したが、コラーゲン繊維および弾性繊維の層内含有量と配列状態はほとんど変化なく、弁葉の厚さに

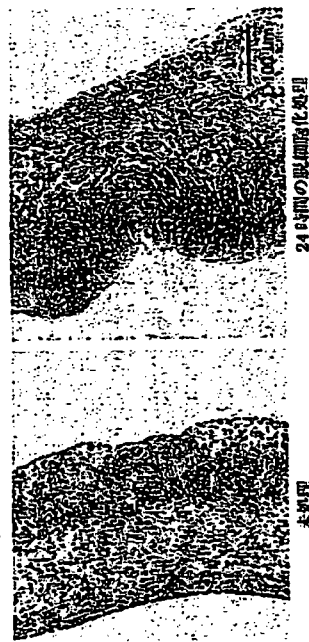


図1 Triton X-100 によって脱細胞化された心臓弁葉の組織断面

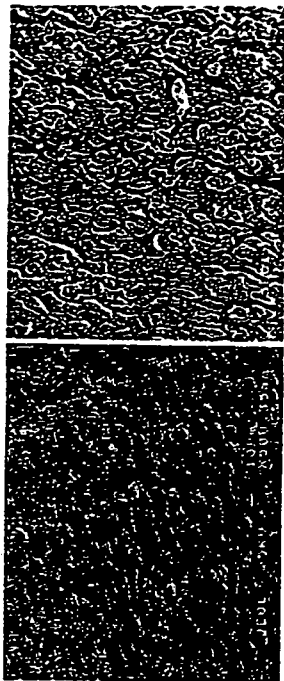


図2 Triton X-100 によって脱細胞化された心臓弁葉の断面

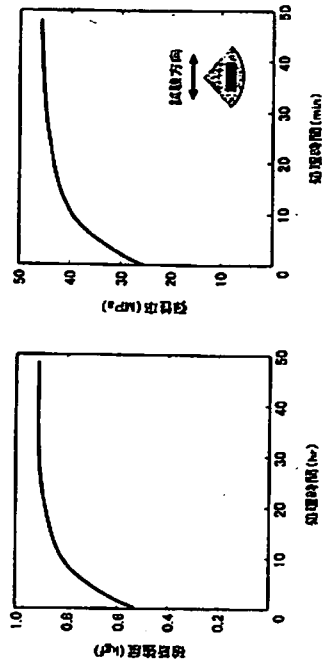


図3 Triton X-100 によって脱細胞化された心臓弁葉の生体力学特性

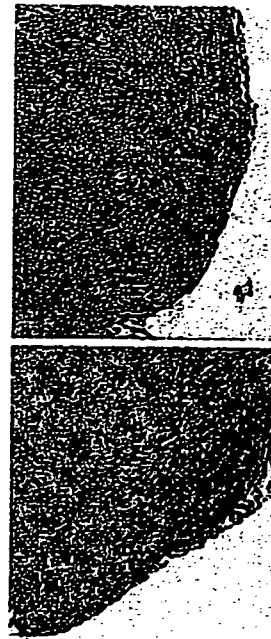


図4 ミニブタに1ヶ月間移植された再生医療心臓弁

も変化は見られなかったため、置換術への影響はないと考えている (図3)。ミニブタ血管内皮細胞は分岐で、内皮細胞増殖地でも増殖させることができ、静置下での培養で弁葉表面に内皮細胞を細胞できた。ミニブタへの移植実験では術後1ヶ月においても良好な弁機能を示しており、自己内皮細胞を移植した再生医療弁では表面が完全に血管内皮細胞で覆われるとともに、組織内部への細胞浸透も見られたのに対し、細胞を播種しないものでは、血管内皮細胞では覆われたものの、組織内への細胞浸透はわずかであった (図4)。

4.5 問題点と将来展望

以上のように、現在、再生医療心臓弁の scaffold には生体吸収性材料と脱細胞化生体組織とが研究されているが、現時点ではどちらが優れているかを見極めることは困難である。新開らの再生医療心臓弁および CryoLife 社の SynerGraft とともに、肺動脈弁では良好な結果が得られているが、大動脈弁では力学強度の問題などから満足な結果が得られていないと報告されている。大動脈弁での血圧に耐えうる scaffold を得るために、吸収性材料の材質および造形方法の改良、あるいは細胞除去方法の改良などが必要であろう。また、脱細胞化処理については組織深部の細胞除去、動脈組織からのウイリス除去などが課題であるが、我々はまったく新しい方法を開発しており、有望な結果を得つつある。一方、細胞の組み込み方法については、いくつかのグループは平滑筋細胞と線維芽細胞を先に播種し、後に血管内皮細胞を (播種) することで複数種の細胞を組み込んでいく。バイオフィアクター投与を用いた細胞播種法の報告が参考となるが¹⁰⁾、弁葉部、弁葉基部、血管壁部のそれぞれに正常組織と同様に複数種の細胞を組み込むことは容易でないと思われる。細胞ソースをどこに求めるのかも検討すべき課題であるが、患者の負担をできるだけ下げるためには、竹筒細胞あるいは末梢血管幹細胞などの利用が有効であろう。さらに臨床応用に際しては、GMP 基調に適合した細胞プロセス設備の設置も必要となる。

すでにいくつかの研究グループは臨床応用を始めており、いずれ、再生医療心臓弁が機械弁や異種生体弁に取って代わる日も近いと信ずる。

謝 辞

我々の研究の一部は、厚生労働省再生医療科学研究費ヒトゲノム・再生医療等研究事業 (H12-再生-005) 並びに新薬開発研究委託事業 (13公-1) の補助を受けて行われた。

文 献

- 1) Stock UA, Noghima M, Khalil PN, Nollert GD, Herdon T, Sperling JS, Moran A, Lion J, Martin DP, Scheen FJ, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 Apr; 119 (4 Pt 1): 732-40.
- 2) Shinoka T, Ma PX, Shum-Tim D, Brueer CK, Cosick RA, Zund G, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered heart valves: Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 1996 Nov 1; 94 (9 Suppl): II164-8.
- 3) Kim WG, Cho SK, Kang MC, Lee TY, Park JK. Tissue-engineered heart valve leaflets: an animal study. *Int J Artif Organs* 2001 Sep; 24 (9): 642-8.
- 4) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollershaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 87-92.
- 5) Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Molias RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000 Nov 7; 102 (19 Suppl 3): III50-5.
- 6) Korossis SA, Fisher J, Ingham E. Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. *Biomed Mater Eng* 2000; 10 (2): 83-124.
- 7) Dohmen PM, Ozaki S, Yporman J, Flameng W, Konertz W. Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; 13 (4 Suppl 1): 93-8.
- 8) Zeltinger J, Landeen LK, Alexander HG, Kidd ID, Sibanda B. Development and characterization of tissue-engineered aortic valves. *Tissue Eng* 2001 Feb; 7 (1): 9-22.

ORIGINAL ARTICLE

Tsuyoshi Kimura, PhD · Sayaka Iwai
Toshiyuki Moritan, PhD · Kwangwoo Nam, PhD
Shingo Mutsuo · Hidekazu Yoshizawa, PhD
Masahiro Okada, PhD · Tsutomu Furuzono, PhD
Toshiya 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 10 min. 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)

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

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

10000 atmospheres (980 MPa) 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-

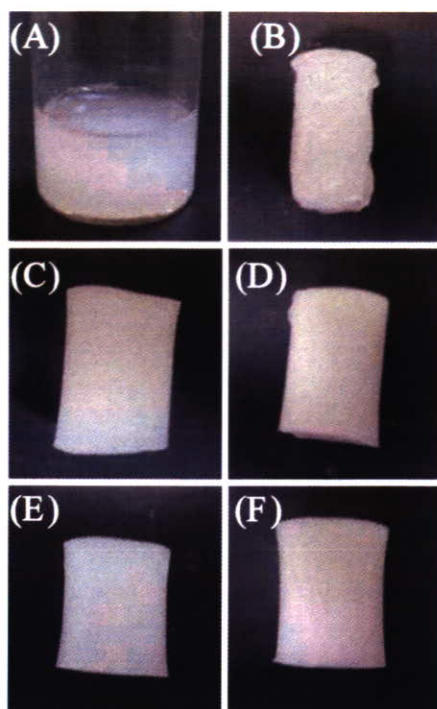


Fig. 1. Photographs of poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogels (A–D) and PVA/DNA (E,F) hydrogels at concentrations of A 3% w/v, B 4% w/v, C,E 5% w/v, and D,F 10% w/v obtained by ultra-high pressure treatment

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,

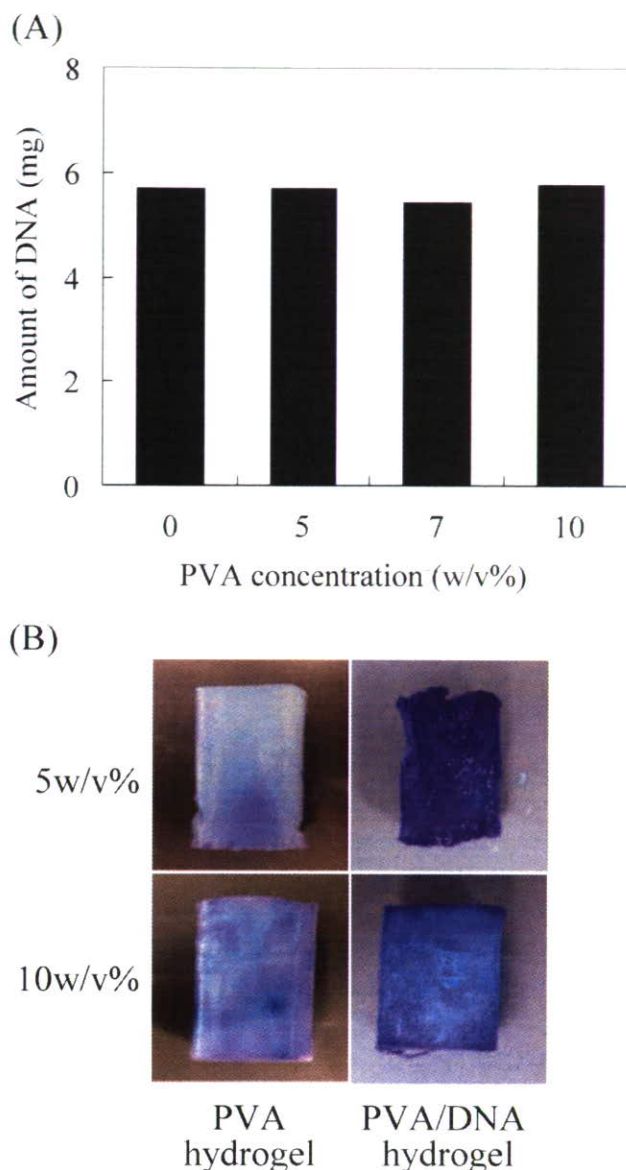
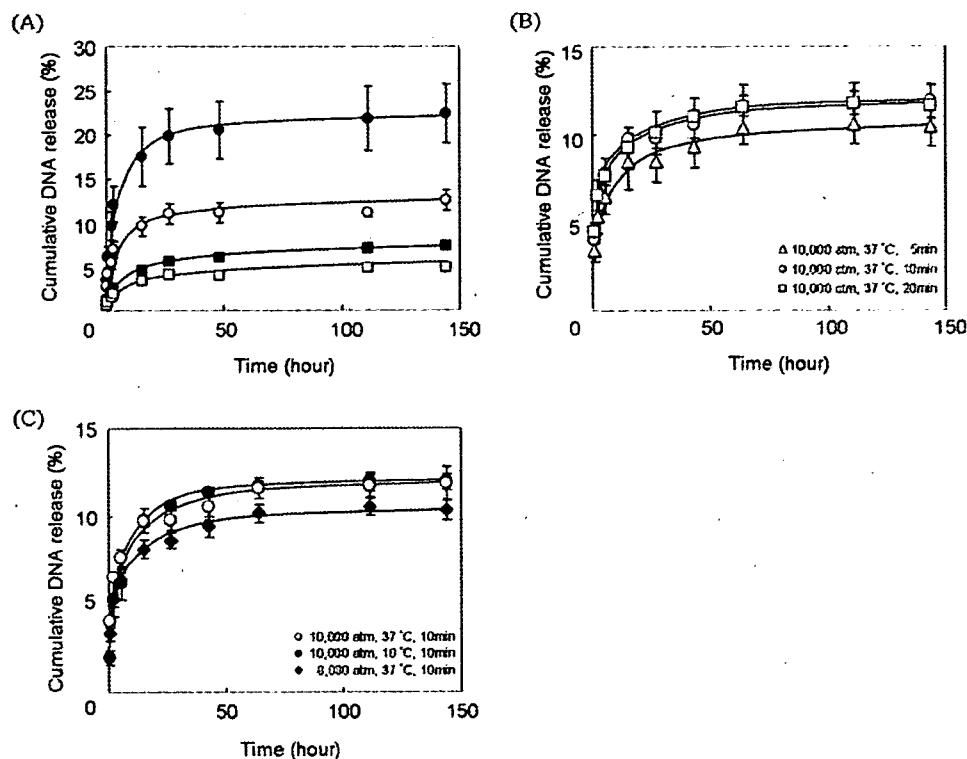


Fig. 2A,B. Presence of DNA in PVA/DNA hydrogels. A Amount of DNA in solution obtained by melting PVA/DNA hydrogels prepared using ultra-high pressure processing. B Photographs of PVA hydrogels and PVA/DNA hydrogels stained with nucleic acid dye

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 10000 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. 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 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-

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.²² 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.^{2,23} 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