

- 6). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels, *Biomaterials*, 28, 3153-3162, 2007
- 7). Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida. Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization, *Controlled Release Society Newsletter*, 24(2), 10-11, 2007
- 8). Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Characteristics of compacted plasmid DNA by high pressurization, *Nucleic Acids Symposium Series*, No51, 343-344, 2007
- 9). Shingo Mutsuo, Kazuya Yamamoto, Tsutomu Furuzono, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Ono, Akio Kishida, Pressure-induced Molecular Assembly of Hydrogen-bonded Polymers, *Journal of Polymer Science Part B, Polymer Physics*, 46, 743-750, 2008
- 10). K Nam, T Kimura, A Kishida, Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents, *Macromolecular Bioscience*, 8, 32-37, 2008
- 11). Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Kwangwoo Nam, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Preparation and characterization of the condensed plasmid DNA by high hydrostatic pressurization, in preparation
- 12). Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Kozo Miyazaki, Toshiya Fujisato and Tsutomu Furuzono, Preparation Of DNA-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier, *Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions*, p471,2005
- 13). 木村剛、南広祐、岩井彩夏、森反俊幸、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压処理により形成した PVA/DNA ハイドロゲルからの DNA 徐放解析、*Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.1*, p214, 2005
- 14). Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Tsutomu Furuzono and Akio Kishida, Gene delivery using hydrogen bonding polymer-DNA complex prepared by ultra high pressure, 32nd Annual meeting & exposition of the controlled release society transactions, p614, 2005
- 15). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた水素結合性高分子/DNA 複合体によるトランスフェクションスケジューリングの可能性、第15回バイオ・高分子シンポジウム講演要旨集、p25-26、2005
- 16). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用、第49回日本学術会議材料研究連合講演会講演論文集、p341、2005

2. 学会発表

- 17). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄

- 伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压法によるナノ無機粒子／高分子コンポジットの調製と遺伝子キャリアーへの応用、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5199-5200, 2005
- 18). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、ナノ無機粒子を内包した超高压誘起 PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5201-5202, 2005
- 19). 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压静水圧処理による分子集合体の開発、第46回超高压討論会、第46回超高压討論会講演要旨集、p141、2005
- 20). 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製、第14回ポリマー材料フォーラム講演予稿集、p171、2005
- 21). 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調製と生医学材料としての応用、第27回バイオマテリアル学会大会予稿集、p227、2005
- 22). 三浦義之、栗田公夫、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起多成分系高分子複合体による遺伝子送達、第5回日本再生医療学会総会抄録、p221、2006
- 23). 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起無機／高分子コンポジットを用いた細胞への遺伝子導入、遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム要旨集、pO-1, 2006
- 24). 仁部洋一、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、エンドソーム遊離促進を目指したナノHAp/PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2056, 2006
- 25). 三浦義之、栗田公夫、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、PEG／多糖水性二相系への超高压処理による新規構造体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p956, 2006
- 26). 木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、遺伝子導入能を有する超高压誘起ナノ無機粒子／高分子／DNA 複合体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2055, 2006
- 27). 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、DNA/RNA 構造制御を目指した超高压印加処理とその応用、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.2, p5288-9, 2006
- 28). Miura, Y, Kurita, K, Nam, K, Mutso, S, Yoshizawa, H, Fujisato, T, Kimura, T, Kishida, A, Preparation of Hydrogen Bonding Polymer Structures Using Ultra High Pressure Technology as Drug Carrier, Abstract for AIChE, 2006
- 29). 木村剛、小粥康充、岡田正弘、古菌勉、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起 PVA/DNA 遺伝子ベクターへの無機塩付加による遺伝子導入促進、第28回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、p286, 2006

- 30). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、吉澤秀和、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫、高圧印加による PVA ハイドロゲルの作製と物性評価、第 18 回高分子ゲル研究討論会講演要旨集、p39-40, 2007
- 31). 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起無機／高分子ハイブリッドベクターによる遺伝子導入における細胞内動態の検討、Drug Delivery System, 21, p292, 2006
- 32). 木村剛、堀内可奈、栗田公夫、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧凝縮 DNA の構造・機能解析と遺伝子導入への応用、再生医療、6、Suppl、p301、2007
- 33). 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧凝縮 DNA の基礎的検討と遺伝子デリバリーへの応用、遺伝子・デリバリー研究会 第 7 回シンポジウム要旨集、32、2007
- 34). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧印加による PEG/多糖水性二相形成の促進、Polymer Preprints, Japan, Vol.56, No.1, 1926 2007
- 35). 三浦義之、木村剛、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫 超高压誘起 PVA ハイドロゲルの調製と物性に関する検討、Polymer Preprints, Japan Vol.56, No.1, 1861, 2007
- 36). 木村剛、堀内可奈、栗田公夫、三浦義之、吉澤秀和、岸田晶夫、高圧凝縮 DNA の調製と機能解析、Polymer Preprints, Japan Vol.56, No.1, 1952, 2007
- 37). Tsuyoshi Kimura, Kwangoo Nam, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Assembling of hydrogen-bonding-polymers using high pressure technology, Proceedings of The International Symposium Organized by Institute of Chemical Research (ICR) Kyoto University, 107-108, 2007
- 38). 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、pH 応答性ナノ無機粒子を含有する水素結合性ポリマー／DNA 複合体の細胞内送達、Drug Delivery System, 22-23, 363, 2007
- 39). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起ナノ高分子集合体の DDS への応用、Fiber Preprints, Japan, 62, No2,(symposia), 14, 62(2), 14, 2007
- 40). Tsuyoshi Kimura, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Cellular delivery of DNA-polymer complex encapsulating inorganic nanoparticles prepared by ultra high pressurization, Tissue Engineering, 13, 1746-47, 2007
- 41). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、小野努、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧技術を用いたプラスミド DNA の凝縮操作、Polymer Preprints, Japan, 56(2), 5323-24, 2007
- 42). 三浦義之、木村剛、栗田公夫、小野努、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高静水压誘起 PVA ゲルの特性解析、Polymer Preprints, Japan, 56(2), 3832, 2007
- 43). 木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、細胞への遺伝子送達における高圧技術応用、第 5 回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集、102, 2007
- 44). 木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、

藤里俊哉、岸田晶夫、遺伝子送達における高圧技術の応用、第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、418, 2007

45). Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, DNA condensation using hydrostatic pressurization for gene delivery, 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract, 302, 2007

46). 木村剛、岸田晶夫、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、圧縮 DNA の遺伝子送達への応用、第2回バイオ・ナノテクフォーラム講演要旨集、A-06, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2007-263704、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」、2007年10月9日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	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) 木村剛、古菌勉、岸田晶夫	遺伝子導入におけるセラミック材料～リン酸カルシウムを中心に～	原島秀吉、田端泰彦	「5号」生物医の新しい材料論 「MOOK」先端医学の伝くを遺伝子ノウ用伝子材料の新たな技術、開	株式会社メディカルドゥ	日本	2006	75-78

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
2) Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida,	Gene Transfection Using Inorganic Particle/PVA/DNA Complexes Prepared by Ultra High Pressure Technology	Molecular Therapy	13, suppl. 1,	S75	2006
3) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida.	Influence of cross-linking on physicochemical and biological properties of collagen-phospholipid hybrid gel	Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.	31, No.2	735-738	2006
4) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gel	Biomaterials	28	1-8	2007
5) Tsuyoshi Kimura, Sayaka Iwai, Toshiya Moritan, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida	Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery	Journal of Artificial Organs	10	104-108	2007
6) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels	Biomaterials	28	3153-3162	2007

7) Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida	Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization.	Controlled Release Society Newsletter	24(2)	10-11	2007
8) Tsuyoshi Kimura., Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida	Characteristics of compacted plasmid DNA by high pressurization	Nucleic Acids Symposium Series	No51	343-344	2007
9) Shingo Mutsuo, Kazuya Yamamoto, Tsutomu Furuzono, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Ono, Akio Kishida	Pressure-induced Molecular Assembly of Hydrogen-bonded Polymers	J. Poly. Sci. Part B, Poly. Phys.	46	743-750	2008
10) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida	Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents	Macromolecular Bioscience	8	32-37	2008
11) Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Kwangwoo Nam, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida	Preparation and characterization of the condensed plasmid DNA by high hydrostatic pressurization				in preparation
12) Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Kozo Miyazaki, Toshiya Fujisato and Tsutomu Furuzono	Preparation of DNA-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier	Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions		471	2005
13) 木村剛、南広祐、岩井彩夏、森反俊幸、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高压処理により形成した PVA/DNA ハイドロゲルからの DNA 徐放解析	Polymer Preprints, Japan	vol54, No.1	214	2005
14) Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Tsutomu Furuzono and Akio Kishida	Gene delivery using hydrogen bonding polymer-DNA complex prepared by ultra high pressure	32nd Annual meeting & exposition of the controlled release society transactions		614	2005

15)木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧技術を用いた水素結合性高分子/DNA 複合体によるトランスフェクションスケジューリングの可能性	第15回バイオ・高分子シンポジウム講演要旨集		25-26	2005
16)木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用	第49回日本学術会議材料研究連合講演会講演論文集		341	2005
17)木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧法によるナノ無機粒子/高分子コンポジットの調製と遺伝子キャリアーへの応用	Polymer Preprints, Japan	Vol.54, No.2	5199-5200	2005
18)木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	ナノ無機粒子を内包した超高圧誘起PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入	Polymer Preprints, Japan	Vol.54, No.2	5201-5202	2005
19)木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫	超高静水圧処理による分子集合体の開発	Special Issue of the review of high pressure science and technology	Vol.15	141	2005
20)木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧印加法による多成分系ポリマー構造体の調製	第14回ポリマー材料フォーラム講演予稿集		171	2005
21)木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調製と生医学材料としての応用	第27回バイオマテリアル学会大会予稿集		227	2005
22)三浦義之、栗田公夫、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧誘起多成分系高分子複合体による遺伝子送達	第5回日本再生医療学会総会抄録		221	2006
23)木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧誘起無機/高分子コンポジットを用いた細胞への遺伝子導入	遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム要旨集		pO-1	2006

24)仁部洋一、木村剛、南 広祐、六雄伸吾、吉澤秀 和、岡田正弘、古菌勉、 藤里俊哉、岸田晶夫	エンドソーム遊離促進 を目指したナノ HAp/PVA /DNA 複合体 による細胞への遺伝子 導入	Polymer Preprints, Japan	Vol.55, No.1,	2056	2006
25)三浦義之、栗田公夫、 木村剛、南広祐、六雄伸 吾、吉澤秀和、岡田正弘 、古菌勉、藤里俊哉、岸 田晶夫	PEG/多糖水性二相系へ の超高压処理による新 規構造体の調製	Polymer Preprints, Japan	Vol.55, No.1,	956	2006
26)木村剛、南広祐、六雄 伸吾、吉澤秀和、岡田正 弘、古菌勉、藤里俊哉、 岸田晶夫	遺伝子導入能を有する 超高压誘起ナノ無機粒 子/高分子/DNA 複合 体の調製	Polymer Preprints, Japan	Vol.55, No.1	2055	2006
27)木村剛、南広祐、六雄 伸悟、吉澤秀和、古菌勉 、藤里俊哉、岸田晶夫	DNA/RNA 構造制御を目 指した超高压印加処理 とその応用	Polymer Preprints, Japan	Vol.54, No.2	5288-5289	2006
28) Miura, Y, Kurita, K, Nam, K, Mutso, S, Yoshizawa, H, Fujisato, T, Kimura, T, Kishida, A	Preparation of Hydrogen Bonding Polymer Structures Using Ultra High Pressure Technology as Drug Carrier	Abstract of AIChE			2006
29)木村剛、小粥康充、岡 田正弘、古菌勉、六雄伸 悟、吉澤秀和、藤里俊哉 、岸田晶夫	超高压誘起 PVA/DNA 遺 伝子ベクターへの無機 塩付加による遺伝子導 入促進	第 28 回日本 バイオマテ リアル学会 大会予稿集		286	2006
30)木村剛、三浦義之、栗 田公夫、吉澤秀和、藤里 俊哉、小林尚俊、岸田晶 夫、	高压印加による PVA ハ イドロゲルの作製と物 性評価	第 18 回高 分子ゲル研 究討論会講 演要旨集		39-40	2006
31)木村剛、南広祐、六雄 伸悟、吉澤秀和、岡田正 弘、古菌勉、藤里俊哉、 岸田晶夫	超高压誘起無機/高分 子ハイブリッドベクタ ーによる遺伝子導入お ける細胞内動態の検討	Drug Delivery System,	21,	292	2006
32)木村剛、堀内可奈、栗 田公夫、南広祐、六雄伸 悟、吉澤秀和、藤里俊哉 、岸田晶夫	高压凝縮 DNA の構造・ 機能解析と遺伝子導入 への応用	再生医療	6, Suppl	301	2007
33)木村剛、吉澤秀和、古 菌勉、藤里俊哉、岸田晶 夫	高压凝縮 DNA の基礎 的検討と遺伝子デリバ リーへの応用	遺伝子・デリ バリー研究 会 第7回 シンポジウ ム要旨集		32	2007

34)木村剛、三浦義之、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫	高圧印加による PEG/多糖水性二相形成の促進	Polymer Preprints, Japan	Vol.56, No.1,	1926	2007
35)三浦義之、木村剛、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫	超高圧誘起 PVA ハイドロゲルの調製と物性に関する検討	Polymer Preprints, Japan	Vol.56, No.1,	1861	2007
36)木村剛、堀内可奈、栗田公夫、三浦義之、吉澤秀和、岸田晶夫	高圧凝縮 DNA の調製と機能解析	Polymer Preprints, Japan	Vol.56, No.1,	1952	2007
37) Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida	Assembling of hydrogen-bonding-polymers using high pressure technology	Proceedings of The International Symposium Organized by Institute of Chemical Research (ICR) Kyoto University		107-108	2007
38) 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	pH 応答性ナノ無機粒子を含有する水素結合性ポリマー/DNA 複合体の細胞内送達	Drug Delivery System	22-23	363	2007
39) 木村剛、三浦義之、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫	超高圧誘起ナノ高分子集合体の DDS への応用	Fiber Preprints, Japan 62, No2,(symposium) 14	62(2)	14	2007
40) Tsuyoshi Kimura, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida	Cellular delivery of DNA-polymer complex encapsulating inorganic nanoparticles prepared by ultra high pressurization	Tissue Eng;	13	1746-47	2007
41)木村剛、三浦義之、栗田公夫、小野努、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫	高圧技術を用いたプラスチック DNA の凝縮操作	Polymer Preprints, Japan	56(2)	5323-24	2007
42) 三浦義之、木村剛、栗田公夫、小野努、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫	高静水圧誘起 PVA ゲルの特性解析	Polymer Preprints, Japan	56(2)	3832	2007

43)木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	細胞への遺伝子送達における高圧技術応用	第5回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集		102	2007
44) 木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫	遺伝子送達における高圧技術の応用	第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集		418	2007
45) Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Tsutomu Furuzono, Kwangwoo Nam, Toshiya Fujisato, Akio Kishida	DNA condensation using DNA using high hydrostatic pressurization for gene delivery	1st Asiam Biomaterials Congress Abstract		302	2007
46) 木村剛、岸田晶夫、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉	圧縮DNAの遺伝子送達への応用	第2回バイオ・ナノテクフォーラム講演要旨集		A-06	2008

遺伝子医学 MOOK 5
Gene & Medicine

先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー

ウイルスを用いない 遺伝子導入法の 材料, 技術, 方法論の新たな展開

別刷

株式会社 メディカルドゥ

9. 遺伝子導入におけるセラミック材料 -リン酸カルシウムを中心に-

木村 剛・古菌 勉・岸田晶夫

セラミック材料のうちリン酸カルシウムを用いた培養細胞への遺伝子導入法（リン酸カルシウム法）は、研究室レベルでの一般的な手法である。細胞傷害性が低く、操作も容易であるが、再現性や導入効率が低いため、その利用は限られる。これらの諸問題に対して詳細な検討がなされ、サイズや溶解性などの遺伝子導入効率への影響が明らかとなりつつある。最近では、ナノテクノロジーによる導入効率の改善や再生医療における遺伝子導入が注目されており、これらの進歩について概説する。

はじめに

骨、歯などの硬組織への代替インプラント材料として用いられるセラミック材料は、アルミナ (Al_2O_3)、ガラス、リン酸カルシウム [ハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: Hap), β -三リン酸カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: β -TCP)] などの様々な物質が検討されているが、遺伝子導入材料としてはリン酸カルシウムが大半を占める。リン酸カルシウムとDNAとの共沈殿物による細胞への遺伝子導入法が1970年代に開発され、特殊な機器、試薬を使用しないため *in vitro* での一般的な遺伝子導入法の1つとなっている。しかしながら、導入効率、安定性、再現性が低いことから、その利用は限られる。最近、これらの問題を解決する手段として、ナノテクノロジーを利用したリン酸カルシウムナノ粒子による遺伝子導入法が考案されている。また、再生医療において他の足場材料（スキャフォールド）との組み合わせによる遺伝子導入が注目されている。ここでは、リン酸カルシウムに重点

を置き、遺伝子導入材料としての合成および物性、さらに遺伝子導入効率との関係について考察したい。

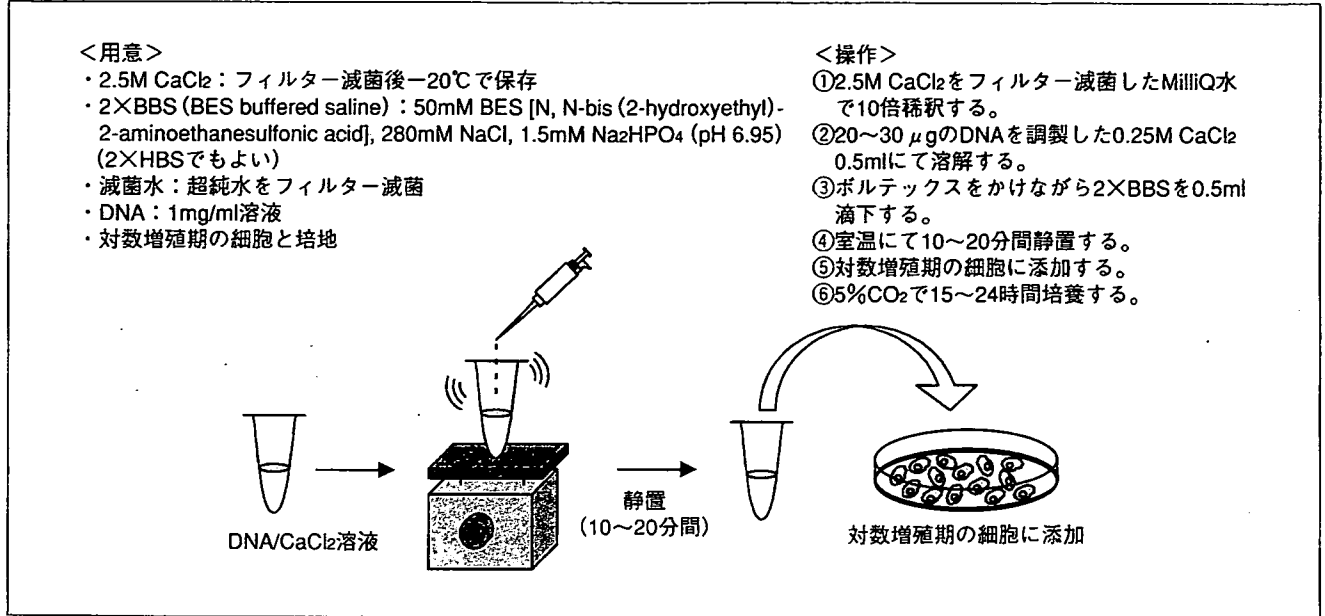
I. リン酸カルシウム法

リン酸カルシウム法は、DNAをリン酸および Ca^{2+} 水溶液に混合することでリン酸カルシウム/DNA共沈殿物を形成させ、それを細胞に取り込ませて遺伝子を導入する方法である。リン酸カルシウムを用いた遺伝子導入は、1973年にGrahamらが報告したリン酸カルシウムとアデノウイルスDNAとの共沈殿物による細胞への導入に始まる¹⁾。その後、プラスミドDNA、ヒト由来細胞の全DNAなどの遺伝子の細胞への導入が報告され、広く用いられるようになった。しかし、導入効率は低く、グリセロール処理や浸透圧ショック法など様々な改良がなされた。Okayamaらは、微小なリン酸カルシウム/DNA共沈殿物を形成させ、それをコアとして培地中で結晶成長させながら細胞に取り込ませる方法を考案し、その結果、種々の細胞での導入効

key words

リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイト、結晶、マイクロエマルジョン、エンドソーム、有機・無機ハイブリッド、再生医療、ナノテクノロジー、ナノ粒子、ナノミセル

図① リン酸カルシウム法による培養細胞への遺伝子導入 (文献2より)



率が改善された³⁾。この方法は、現在の一般的プロトコルとなっている (図①)。リン酸カルシウム法は、特殊な機器を必要とせず、安価な試薬で簡便に行えるが、その一方で再現性が低く、また高分子・脂質などの他の遺伝子導入材料と比べて導入効率は依然として低い。この原因の1つとして、リン酸カルシウムの結晶成長を制御できないため、様々な形態・サイズの共沈殿物が得られることが挙げられる。リン酸カルシウムは、その結合状態により様々な種類があり、水中での溶解性は異なる (図②)³⁾。Yangらは、様々なpHにおける共沈殿物の形態変化をTEM観察した⁴⁾。pH6.48, 6.82, 6.91, 7.01では個々に分散した微小な球状粒子が形成されるが、pH 7.12, 7.25, 8.13, 10.01では不規

則な凝集塊が観察され、微小なpH変化が共沈殿物の形成に強く影響することが明らかとなった。また、サイズと遺伝子導入効率の相関が示され、微小粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集化に伴い導入効率は減少する⁵⁾⁶⁾。これは、リン酸カルシウム結晶の細胞への導入がエンドサイトーシスによるためであり⁷⁾、大きな凝集塊では十分に細胞に導入されないことが原因であると考えられている。

図② リン酸カルシウムの種類と水中での溶解性 (文献3より改変)

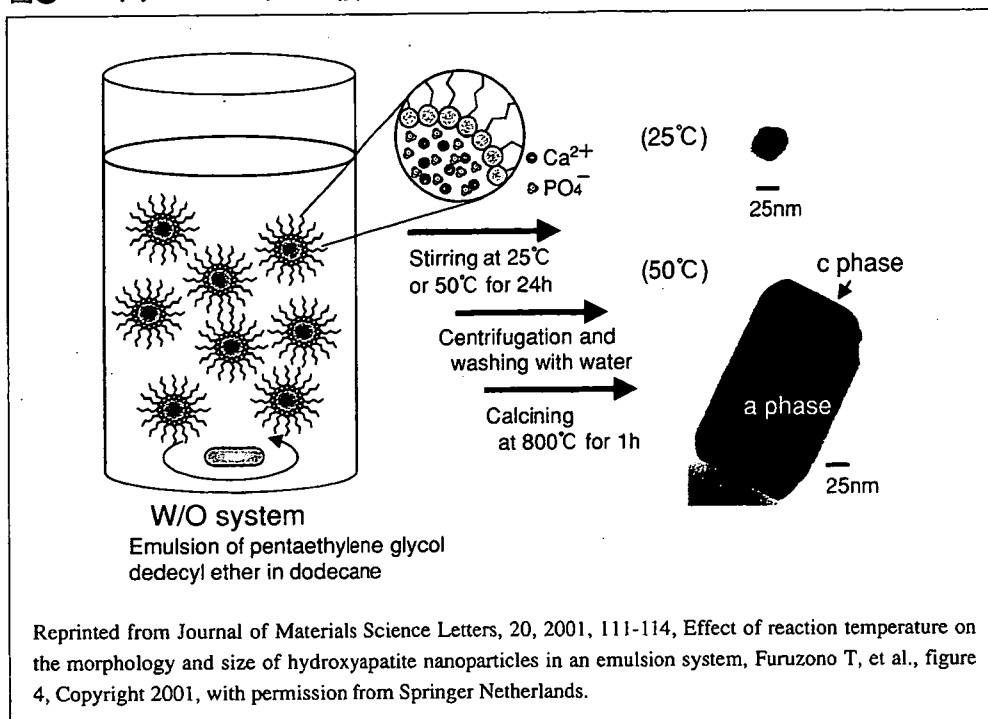
種類	化学式
一リン酸カルシウム	Ca(H ₂ PO ₄) · H ₂ O
リン酸4カルシウム	Ca ₄ P ₂ O ₉
三リン酸カルシウム	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂
二リン酸カルシウム	CaHPO ₄ · 2H ₂ O, CaHPO ₄
リン酸4カルシウム	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ · 5H ₂ O
三リン酸カルシウム	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂
ハイドロキシアパタイト	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂

溶解度: 大 (↑) / 小 (↓)

II. リン酸カルシウムナノ粒子

上述のように微小なリン酸カルシウム/DNA共沈殿物により効率よい遺伝子導入が達成されることから、安定かつ均一に分散したナノサイズのリン酸カルシウム/DNA複合体の創製が試みられている。著者らは、ナノスケールでサイズを制御したHApの合成法を考案した⁸⁾。合成法と得られたHApナノ粒子1個のTEM像を図③に示す。結晶化反応の温度が25℃では球状、50℃ではロッド状のHAp粒子が調製され、温度コントロールによりHApナノ粒子のサイズおよび形態を制御することが可能である。また、電子線回折パターン解析では、a面、c面の形成が確認された。a面はカルシウムリッチ、c面はリン酸イオンリッチな面とされており、結晶成長制御による粒子1個における電

図3 マイクロエマルジョン法によるハイドロキシアパタイトの調製 (文献8より)



荷の制御が可能であることを示している。現在、これらを用いた遺伝子導入を検討している。また、MozumdarらによりプラスミドDNAを内包するリン酸カルシウムのナノ粒子も開発されている⁹⁾⁻¹¹⁾。ヘキササン中に界面活性剤である sodium bis (ethylhexyl)-sulphosuccinate のマイクロエマルジョンを分散させ、CaCl₂ とプラスミドDNA を添加した A 液、Na₂HPO₄ とプラスミドDNA を添加した B 液を作製し、A、B 液を混合後、数時間反応させることでナノ粒子が形成される。得られたDNA を含有するナノ粒子は約 80nm のサイズを有し、XRD 測定により粒子の一部が HAp 構造であることが明らかとなった。in vitro 遺伝子導入では、市販の高分子系遺伝子導入剤である PolyFect® 以上の導入効率を示されている。同様の合成法でリン酸マグネシウム、リン酸マンガンとプラスミドDNA とのナノ粒子も調製される¹¹⁾。Akaike らは、カルシウムがマグネシウムに置換され、結晶成長が抑制されることに着目し、ナノサイズのリン酸カルシウム-マグネシウム/DNA 共沈殿物を調製し、遺伝子導入効率の改善に成功している¹²⁾¹³⁾。さらに、Kataoka らは、高分子ミセルの内核でリン酸カルシウム結晶を形成させる方法を考案した¹⁴⁾。プラスミドDNA のみで

はなく、短鎖のオリゴDNA および siRNA の内包が可能であり、いずれも粒径数百 nm のミセルが形成される。この有機・無機ハイブリッドナノミセルの細胞質内へのデリバリーおよび核移行が示され、siDNA の導入による顕著な遺伝子ノックダウンが培養細胞系において確認されている。これは、エンドソームの pH が 5.5 であり、リン酸カルシウムの溶解によって核酸分子の効率的なエンドソームエスケープがなされたと考えられている。脂質/DNA の粒子やヒストン H1/DNA 複合体においても、リン酸カルシウム共存下において遺伝子発現効率の向上が示され、リン酸カルシウムのエンドソームエスケープ能が示唆されている¹⁵⁾¹⁶⁾。

ナノテクノロジーの導入により安定かつ均一なナノサイズのリン酸カルシウム粒子の調製が可能となり、またエンドソーム破壊を促進する機能を有することが示唆され、今後、他の素材とのハイブリッド化あるいは助剤としての発展が期待できる。

Ⅲ. 再生医療におけるリン酸カルシウムと遺伝子導入

再生医療におけるリン酸カルシウムによる遺伝

子導入は、コラーゲン、ポリ(乳酸-グリコール酸) (PLAGA) などのスキャフォールドとの組み合わせで検討されている。Kasugaiらは、リン酸カルシウム/DNA 共沈殿物を含有するアテロコラーゲンの凍結乾燥ペレットあるいはゲルを作製し、骨髄、ラット皮下での導入遺伝子の発現を報告している¹³⁾。また、Laurencinらは、リン酸カルシウム/DNA/PLAGA マイクロスフェアを調製し、このマイクロスフェア表面に生着させた培養細胞への遺伝子導入に成功している¹⁴⁾。一方、リン酸カルシウムのうちHAp, β -TCPは、骨補填材料(人工骨)として既に実用化されており、骨・軟骨の再生に向けた骨髄細胞、骨芽細胞、骨膜細胞などのスキャフォールドとして数多く検討されている。また、再生医療においては細胞を大量に使用するため細

胞を効率よく増幅させるバイオリクター技術を必要とし、HApは細胞担時体としても検討されている。

おわりに

本稿では、セラミックのうち遺伝子導入に汎用されているリン酸カルシウムに重点をおき、遺伝子導入におけるリン酸カルシウムの合成(結晶化)および物性の重要性を述べた。サイズ、結晶化度、安定性が遺伝子導入効率に強く影響し、微小な粒子で高い導入効率が示される。今後、ナノテクノロジー、有機材料とのハイブリッド化技術などのさらなる技術進展により物性制御がなされ、安全かつ高効率な遺伝子導入素材としての開発が期待される。

参考文献

- Graham FL, van der Eb AJ : *Virology* 52, 456-467, 1973.
- Chen C, Okayama H : *Mol Cell Biol* 7, 2745-2752, 1987.
- 青木秀希, 驚異の生体物質アパタイト, 医歯薬出版, 10-11, 1999.
- Yang YW, Yang JC : *Biomaterials* 18, 213-217, 1997.
- Chowdhury EH, Sasagawa T, et al : *Anal Biochem* 314, 316-318, 2003.
- Jordan M, Schallhorn A, et al : *Nucleic Acids Res* 24, 596-601, 1996.
- Orrantia E, Chang PL : *Exp Cell Res* 190, 170-174, 1990.
- Furuzono T, Walsh D, et al : *J Mater Sci Lett* 20, 111-114, 2001.
- Roy I, Mitra S, et al : *Int J Pharm* 250, 25-33, 2003.
- Bisht S, Bhakta G, et al : *Int J Pharm* 288, 157-168, 2005.
- Bhakta G, Mitra S, et al : *Biomaterials* 26, 2157-2163, 2005.
- Chowdhury EH, Megumi K, et al : *Anal Biochem* 328, 96-97, 2004.
- Chowdhury EH, Kunou M, et al : *Gene* 341, 77-82, 2004.
- Kakizawa Y, Furukawa S, et al : *J Control Release* 97, 345-356, 2004.
- Sandhu AP, Lam AM, et al : *Anal Biochem* 341, 156-164, 2005.
- Zaitsev S, Buchwalow I, et al : *Acta Histochem* 104, 85-92, 2002.
- Kuroda S, Kondo H, et al : *J Pharmacol Sci* 97, 227-233, 2005.
- Kofron MD, Laurencin CT : *Biomaterials* 25, 2637-2643, 2004.

参考図書

* 驚異の生体物質アパタイト, 青木秀希, 医歯薬出版, 1999.

参考ホームページ

- 東京医科歯科大学生体材料工学研究所分子制御分野岸田研究室
<http://www.labonet.net/kishida/index.php>
- 東京医科歯科大学生体材料工学研究所
<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/index.html>
- 国立循環器病センター研究所生体工学部
<http://www.ncvc.go.jp/res/seitai/seitaij.html>

木村 剛

- 1997年 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科卒業
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科高分子学専攻
- 1999年 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科機能科学専攻
- 2003年 工学博士(京都工芸繊維大学)
国立循環器病センター研究所生体工学部流動研究員
- 2004年 東京医科歯科大学生体材料工学研究所分子制御分野助手

(CP), calcium carbonate and hydroxy apatite (HAp), promote the endosomal escape of transferred DNA because the inorganic particles are dissolved under low pH condition in endosome vesicles and then the rupture of endosome is induced by osmotic shock. We performed the development of inorganic particle/PVA/DNA complexes using UHP technology. Plasmid DNAs encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene or luciferase gene under CMV promoter were used. Nano-HAps having the average diameter of 50nm were synthesized by modified micro-emulsion method. Nano-HAp was dispersed ultrasonically in PVA solution and then mixed with DNA solution. CP/DNA complexes were prepared by general method and mixed with PVA solution. Their mixtures were treated under 10000 atmospheric pressures at 40 degree for 10min. By SEM observation, the irregular surface of inorganic particles/PVA/DNA complexes was observed, indicating the encapsulation of inorganic particles in PVA/DNA particle. The nano-HAp/PVA/DNA complexes showed a higher transfection activity than DNA complexes with nano-HAp or PVA. With CP/PVA/DNA complexes, also, the transfection activity increased several fold than the PVA/DNA complexes. These results indicate the utility of the inorganic particle/PVA/DNA complexes prepared by the UHP treatment for DNA delivery.

193. Gene Transfection Using Inorganic Particle/PVA/DNA Complexes Prepared by Ultra High Pressure Technology

Tsuyoshi Kimura,¹ Kwangoo Nam,¹ Sihngo Mutsuo,² Hidekazu Yoshizawa,² Masahiro Okada,³ Tsutomu Furuzono,³ Toshiya Fujisato,⁴ Akio Kishida.¹

¹*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan;* ²*Department of Environmental Chemistry and Materials, Okayama University, Okayama, Japan;*

³*Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan;*

⁴*Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan.*

Various non-viral gene systems, such as naked DNA, lipoplexes, micelles and polyplexes, have been developed for effective and safe gene delivery into target cells. Although cationic compounds were employed as gene carriers due to the ability of complex formation with DNA electrostatically and effective gene transfer into cells, the intrinsic cytotoxicity of them is essential problem in non-viral gene delivery system. Therefore, we have tried the development of DNA complex with non-ionic, water soluble polymers via hydrogen bond using ultra high pressure (UHP) technology because the inter-, intramolecular weak hydrogen bonding interaction was empathized with high pressure process. Previously, polyvinyl alcohol (PVA) was utilized as the model hydrogen bonding polymers, and the PVA/DNA complexes were obtained by UHP treatment. Although the PVA/DNA complexes were up-taken by cells, a little enhancement of gene expression was observed using them. In this study, we hypothesize that inorganic particles, such as calcium phosphate

Influence of Cross-linking on Physicochemical and Biological Properties of Collagen-Phospholipid Polymer Hybrid Gel

Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura and Akio Kishida

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University Kanda-Surugadai 2-3-10, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan.
FAX:81-3-5280-8029, e-mail: bloodnam.fm@tmd.ac.jp

To adopt collagen as a biomaterial, collagen should be modified due to disadvantages such as poor mechanical strength and high thrombogenicity. Preparation of collagen-polymer hybrid gel for application as an artificial vascular graft was executed by immobilizing 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer, poly(MPC-co-methacrylic acid) (PMA), using *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide and *N*-hydroxysuccinimide as cross-linkers. In order to alter the density of interchain cross-links (intermolecular bonding) between collagen fibrils and the MPC polymer chains, collagen-polymer hybrid gel was prepared by changing the mole ratio of MPC moiety of PMA. The intra- and interhelical cross-links made the gel thermodynamically stable. The interchain cross-links made the gel mechanically and dimensionally stable by supporting the network structure of the hybrid gel, which is thought to be achieved by connecting collagen fibrils. Enzymatic stability was depending on the density of interchain cross-links, because the adsorption of collagenase was prohibited. Increase in the MPC moiety made the gel cell adhesion property decrease. This implies that the interaction between cells and surface of the hybrid gel is being regulated by the MPC groups, making the hybrid gel much efficient for artificial vascular graft use.

Key words: collagen, phospholipids polymer, cross-link, gel, cell adhesion

1. INTRODUCTION

In order to use collagen for a biomaterial product, the cross-linking of collagen and/or immobilizing synthetic polymer with collagen to is indispensable. Non-treated natural collagen cannot directly be applied to the biological system due to disadvantages such as poor mechanical strength, calcium deposition, and high thrombogenicity. However, the collagen is biocompatible and non-antigenic, synergic with bioactive component, easily modifiable, and available in abundance, which makes it suitable for medical application [1-3]. While keeping the advantageous property of collagen, disadvantageous property should be eliminated or be complemented.

Cross-link method using *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) was chosen for this study [4,5]. Cross-linking collagen with EDC and NHS makes 'zero-length' amide cross-links between carboxylic acid groups from aspartic and glutamic acid residues, and ϵ -amino groups from (hydroxy-) lysine residues forming intra- and interhelical cross-link to prepare an EDC/NHS cross-link collagen gel [5]. And, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) based copolymer, which is known for its excellent biocompatibility [6], was used to cross-link the microfibrils of collagen to produce a hybrid gel having biocompatibility and improved mechanical

strength.

In this study, we investigated the network structure of the collagen-phospholipid polymer hybrid gel and the effect to the mechanical strength, thermal stability, dimensional stability, and enzymatic stability against collagenase. Furthermore, the biological property of the collagen gel was examined to evaluate the application as an artificial blood vessel.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Preparation of EDC and NHS Cross-linked Collagen Gel

Preparation of EDC and NHS cross-linked collagen gel (E/N gel) was executed by using 0.5wt% collagen type I solution (pH 3, KOKEN, Tokyo, Japan). Collagen solution was fabricated into film. Then the collagen film was immersed into the 0.05M 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) buffer (pH 9) (Sigma, St Louis, USA) containing EDC (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan) and NHS (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan). The cross-linking procedure was executed for 4 hours at 4°C to make a cross-linked gel (E/N-al gel). After 4 hours, the reaction was stopped and the gel was then washed with 4M of Na₂HPO₄ aqueous solution for 2 hours to hydrolyze any remaining *O*-acrylisourea groups and then with distilled water for 3 day to remove salt from the gel. The molar ratio of each chemical was fixed to EDC:NHS:collagen-carboxylic acid groups=5:5:1.

2.2 Preparation of MPC-immobilized Collagen gel

Preparation of the MPC-immobilized Collagen gel (MiC gel) was executed by using E/N-al gel. poly(MPC-co-methacrylic acid) (mole ratio: MPC:methacrylic acid=3:7, PMA30) (Figure 1) was added with EDC and NHS in MES buffer (pH 10) and was pre-activated for 10 minutes before E/N-al gel was immersed. The molar ratio of each chemical was fixed to EDC:NHS:carboxylic acid groups of PMA =5:5:1. The immobilization of PMA to the collagen was continued for 4 hours at 4°C. Then the gel was washed with 4M of Na₂HPO₄ aqueous solution for 2 hours and then with distilled water for 1 day to remove salt from the gel to prepare a salt-free MiC30 gel. To increase the MPC moiety of the collagen-polymer hybrid gel, PMA90 (MPC:methacrylic acid=9:1) was prepared and immobilized to the collagen to make a MiC90 gel.

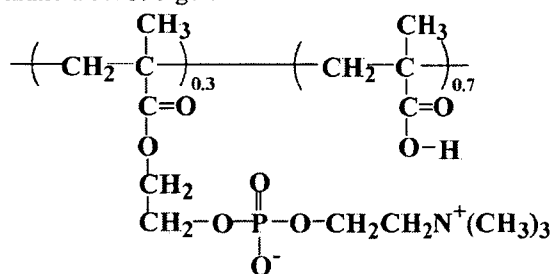


Figure 1. Chemical structure of PMA.

2.3 Surface Characterization

The surface analysis was executed using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS; AXIS-HSi, Shimadzu/KRATOS, Kyoto, Japan) and Scanning electron microscopy (SEM; SM-200, Topcon, Tokyo, Japan). Samples which had been cut into small pieces were lyophilized for overnight. The chemical composition of the surfaces of the gel (upper part of the gel) was determined by releasing angle of the photoelectrons fixed at 90°. The morphologies of the gels were observed with a SEM. The razor-blade cut surfaces of respective gels were observed.

2.4 Network Characterization

The shrinkage temperature of the gels were determined using differential scanning calorimeter (DSC; DSC6000, Seiko, Chiba, Japan) in the range of 0°C to 150°C at the scanning rate of 5°C/minute.

Stress-strain curves of respective collagen gels were determined by uniaxial measurements using a tensile strength tester (STA-1150, Orientec, Tokyo, Japan). The sample for the measurement was prepared in the size of 4cm×1cm. The obtained data were changed to stress-strain curve of the samples and the elongation modulus was calculated.

The swelling test of respective samples was executed by cutting lyophilized gels into small pieces and putting into pH aqueous solution at 37°C. The pH of the aqueous solution was controlled to make 7.4. The gels were shaken gently for 24 hours and taken out to measure the

changed weight of the sample. Swelling ratio was calculated in order to define the exact swelling phenomenon brought up by water absorption.

2.5 Enzymatic Degradation

The degradation test of the gel samples were executed using collagenase from Clostridiopeptidase histoliticum (EC 3.4.24.3, Sigma, St Louis, USA) with collagenase activity of 320 units/mg. In this experiment, collagen gels were immersed into Tris-HCl buffer solution with total concentration of collagenase 100units/mL. The weight of the gels after reaction with collagenase was measured from 1 to 72 hours.

2.6 Cell adhesion test

L-929 cells (mouse fibroblast) were used to evaluate the interaction between collagen gels and the cells. The fibroblasts were culture in Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM; Gibco, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, NY, USA) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After treatment with 0.25% trypsin, the cell density was adjusted to 5×10³ cells/mL and the cells were seeded on the surface. The collagen gels were sterilized by putting gels into ethanol:water 50:50 for 2 hours, than 70:30 for 2 hours, and 100:0 for an overnight before lyophilizing. The lyophilized gels were hydrolyzed with E-MEM for 5 minutes and the E-MEM was disposed just before cell seeding. After 24 hours and 48 hours, the number of adhering cells was determined using lactate dehydrogenase (LDH) assay at 560nm with UV/VIS spectrophotometer (V-560, Jasco, Tokyo, Japan).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Surface Characterization

All gels showed XPS signals attributed to carbon in CH₃- or -CH₂-, -COC-, C(=O)-, and nitrogen in -CONH- was observed at 285, 286.6, 288.5, and 400.8eV, respectively. A phosphorus peak and one nitrogen peak in -N⁺(CH₃)₃ was observed at 134eV and 403.2eV, respectively, indicating that PMA was properly cross-linked collagen [6]. Figure 2 shows the images of the outer surface (upper part of the gel) and razor blade-cut surface (cross-section) morphology of respective collagen gels observed with SEM. All outer surfaces that are immobilized with PMA show non-porous homogenous structure. When the razor-cut surface was observed, relatively porous (or hollow) layer that is composed of many thin plates, and non-porous (or dense) layer was seen. Hollow layer is thought be the uncross-linked collagen (a collagen gel that is prepared under pH 9.0 MES buffer without any cross-linker; Uc gel) or intra- and interhelically cross-linked collagen layer. The non-porous layer representing PMA is deposited on the collagen layer and the thickness increases as more PMA is adopted. However, we are not sure yet how the deposited layer would affect the physical property of the hydrogel. We are working on this and would be reported soon.

3.2 Network Characterization

Table I shows the change of the shrinkage temperature (T_s) of each collagen gels. The cross-linking brought the increase in the T_s . And the T_s would increase further as the PMA is immobilized, but would never cross 85°C. Since the denaturation

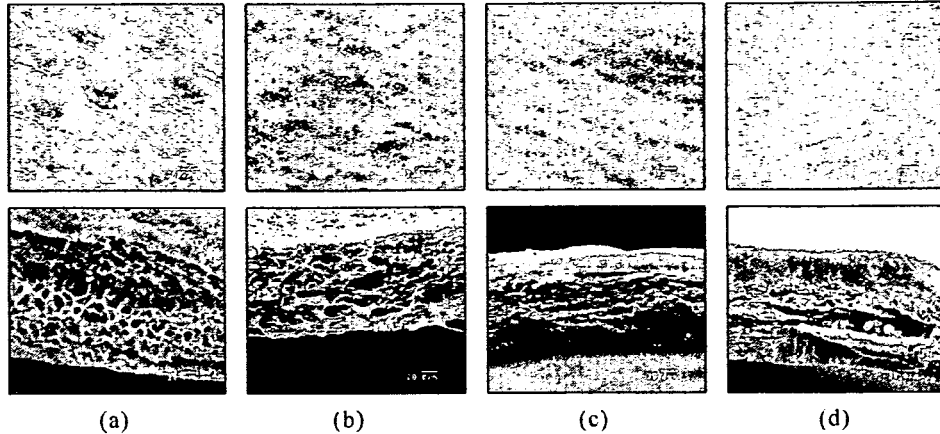


Figure 2. SEM images of collagen gels. (a) Uc gel, (b) E/N gel, (c) MiC90 gel, and (d) MiC30 gels. Upper images imply the outer surface and below images indicate the razor-cut surface of the gels.

temperature is the endothermic transition of the triple helix of the collagen molecules to the random coil, it is believed that intra- and interhelical cross-link controls the T_s , [7]. When the higher amount of EDC and NHS was used, the T_s would increase up to 83°C (data not shown). This implies that the increase in the T_s is not due direct connection between collagen microfibrils and polymer chain but due to complexity of the network. So, the stability of the collagen gels against temperature is dependant not only on intra- and interhelical cross-links, but also on the density of the network.

Table I. Shrinkage temperature of respective collagen gels.

Sample	Shrinkage temperature (°C)
Uc gel	56±8
E/N gel	74±3
MiC90	76±3
MiC30	84±4

The elongational modulus increases as PMA is immobilized, indicating it is the interchain cross-link that reinforces the mechanical strength. The elongational modulus of MiC gels measured at 1% strain and 8% strain showed that approximately 10~13 times increase compared to Uc-gel while that of E/N gel showed approximately 5 times increase. This indicates that the network is much denser for MiC gels, which directly affected the mechanical strength.

All collagen gels showed 1.4~2 times increase in elongational modulus at 8% strain compared to that of at 1% strain, indicating soft tissue viscoelastic behavior can be maintained after immobilizing with PMA. So, biomaterial possessing biological property can be obtained.

Figure 3 shows the swelling of the respective gels under pH 7.4. For uncross-linked gel, the gel dissolved under pH 2.1, while swelled

approximately 1400% under pH 7.4. When collagen gels absorb water, the triple helix structure is known to turns to random coil conformation, because collagen peptide chains increases accessibility to hydration. In the neutral and alkaline pH conditions, collagen film would be stabilized by forming entanglement of fibrils formed by hydrophobic and electrostatic bonds.

E/N-al gels shows swelling ratio of 320% under pH 7.4. As mentioned earlier, EDC and NHS is known to be bring inter- and intrahelical cross-links, holding the α -helices together tightly. However, its low cross-linking density due to high free amine group contents makes the gel to swell high.

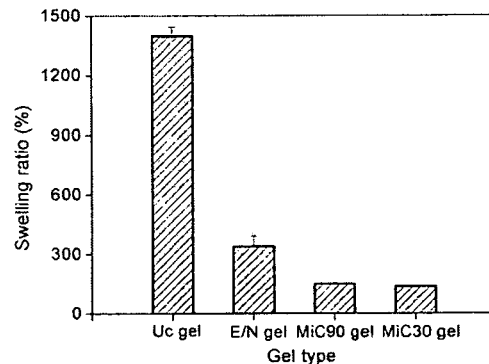


Figure 3. Swelling ratio of respective collagen gels in pH 7.4

MiC gels shows much suppressed swelling ratio. The decrease in the swelling ratio comparing to E/N gel indicates that the dense network has formed. Denser network between collagen and PMA is thought to be formed by interchain cross-links by connecting microfibrils together, increasing the toughness of the collagen gel. Furthermore, the high mechanical strength of the hybrid gel is suppressing the absorption of water, leading to low swelling ratio

3.3 Enzymatic Degradation

Figure 4 shows the degradation of collagen gels caused by the activation of collagenase in Tris-HCl buffer. Collagen gel would be degraded once it encounter with collagenase. Collagenase would cleave the helical segment, which makes the collagen gels to hydrolyze. Collagenase is known to absorb onto the collagen fibers once it penetrates into the fiber [7]. Our study shows that the collagen gel that is not cross-linked would be degraded within 2 or 3 hours. Cross-linking the collagen with EDC and NHS would maintain the helical structure firmly, extending the complete degradation time from 3 hours to 24 hours. And as mentioned previously, the E/N-gel possesses higher intra- and intercross-link chains, making the gel to endure longer time against collagenase.

MiC gels showed higher stability against collagenase. The network of the collagen gel is thought to be denser than E/N gel, as described previously. For E/N gels, the absorption of collagenase eventually made it to be dissociated within 24 hours. On the other hand, MiC gels possess interchain cross-link, which links the microfibrils and the PMA chains, making the gel to swell much lower. And the cleavage by collagenase would be prevented by the PMA-collagen network which links fiber and polymer chain together, shielding the helices

Comparing the degradation rate between MiC gels, we can see that as MPC ratio increases, the degradation is much faster. This is because the network of the MiC90 is thought to be much sparse than MiC30, due to low mole ratio of methacrylic acid moiety. This makes the space between collagen and PMA larger, resulting in higher water absorbance.

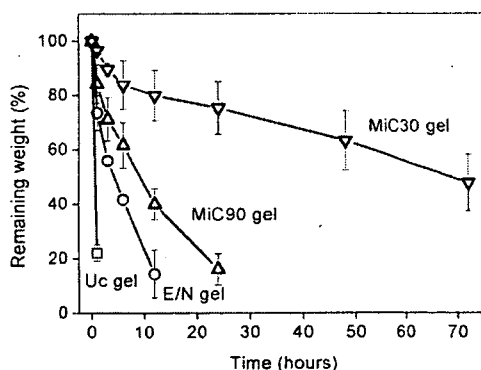


Figure 4. Degradation of collagen gels by collagenase in Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 37°C.

3.4 Cell Adhesive property

When the number of adhered cells after 24 hours and 48 hours were compared among the collagen gels, and those with PMA immobilized on collagen gels were much lower than without PMA. This is clearly due to PMA polymer covering the surface of the collagen gel. The number of cell adhered on the surface decreased as the moiety of MPC unit increased. The difference between number of adhered cell on the

surface after 24 and 48 hours was compared, the increase in the number of cells was observed for collagen gels. However, for MiC gels, increase was suppressed. Polymer immobilized on the collagen blocks the interaction between fibroblast and collagen, which is known to be the most decisive factor for cell adhesion [8].

4. CONCLUSION

The preparation of MiC gel was successfully achieved. Immobilization of MPC polymer made the gel tougher and stable. We could confirm that the stress-strain responded as generally observed for soft biological materials. Increase in the MPC unit brought the higher swelling, which lead to the faster degradation by collagenase. It is thought that the higher amount of adopted PMA have caused the formation of sparse cross-link network, which in turn make the surface of the MiC gel full of MPC head groups, reducing cell adhesion ability.

The increase in the MPC unit would bring higher biocompatibility, while increase of MA unit would allow increment of mechanical strength. As the concentration of MPC increased, it is thought that the biocompatibility would increase but toughness decrease.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financially supported by Grant from the research on Health Science focusing on Drug Innovation (KH61060) of the Japan Health Sciences Foundation and Health and Labour Sciences Research Grants.

REFERENCES

- [1] W. Friess, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 112-136 (1998).
- [2] K. Fujioka, M. Maeda, T. Hojo, and A. Sano, *Adv. Drug Del. Rev.*, **31**, 247-266 (1998).
- [3] C.H. Lee, A. Singla, and Y. Lee, *Int. J. Pharma.*, **221**, 1-22 (2001).
- [4] L.H.H. Olde Damink, P.J. Dijkstra, M.J.A. van Luyn, P.B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, and J. Feijen, *Biomaterials*, **17**, 765-773 (1996).
- [5] M.J.B. Wissink, R. Beernink, J.S. Pieper, A.A. Poot, G.H.M. Engbers, T. Beugeling, W.G. van Aken, and J. Feijen, *Biomaterials*, **22**, 151-163 (2001).
- [6] K. Ishihara, T. Ueda, and N. Nakabayashi, *Polym. J.*, **22**, 355-360 (1990).
- [7] R. Zeeman, P.J. Dijkstra, P.B. van Wachem, M.J. van Luyn, M. Hendriks, P.T. Cahalan, and J. Feijen, *Biomaterials*, **20**, 921-931 (1999).
- [8] J. Watanabe and K. Ishihara, *Artif Organs*, **27**, 242-248 (2003).

(Received January 31, 2006; Accepted June 2, 2006)