

が人工心臓用に用いられている。セグメント化ポリウレタンは、表面特性を考慮して分子設計された生体用材料の例である。図4-10に、これまでに開発されてきた生体用ポリウレタンの構造式を示す。これらの中にはすでに開発が終了しているものもある。

ポリウレタンの表面組成は不均質であり、表面層には異種のドメインが分散している。このような表面のヘテロ構造が抗血栓性を発現するのは、血漿たんぱく質の迅速な吸着層形成による界面不活性化が寄与しているため、と考えられている。1970年代半ばまでに、均質な表面では抗血栓性は獲得できないと結論づけられた。その後、新しい概念として2種類以上の異なるポリマー鎖を有するいわゆる多相性高分子表面による抗血栓性獲得の考え方が、提起された。

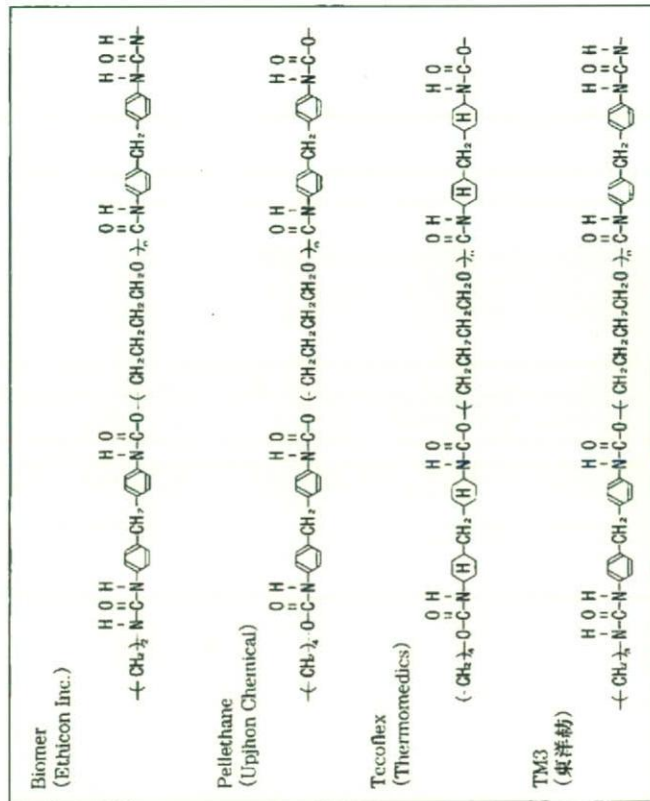


図4-10 これまでに開発された医療用セグメント化ポリウレタン。

SPUは、エラストマー<sup>88</sup>としての優れた弾性に加えて、相対的に高い耐疲労性を示す。これらの特性は、人工心臓用材料に必要な機械的特性である。この特性は、ミクロ相分離構造によって発現される。分子中のハードセグメントのクラスタがソフトセグメントの連続相中に分散した構造をしている(図4-11)。これらの材料ではソフトセグメントの主成分であるポリエーテルの鎖長を変えると血液適合性も大幅に変化する。鎖長の最適値が存在する。

ポリエーテルとして、比較的疎水性の高いポリテトラメチレングリコール(PTMG)がよく用いられる。低親水性ポリプロピレングリコール(PPG)や、高親水性ポリエチレングリコール(PEG)を使うと、親水性表面が形成される。一方、両末端にアミノ基や水酸基を有する反応性ポリジメチルシロキシサン(PDMS)をソフト成分として使用すると、PTMGよりも強い疎水性のセグメント化ポリウレタンが合成できる。A-B-Aブロック型のポリエーテル(PEG-PPG-PEG)やPEG-PDMS-PEGを用いることもできる。PEGのような親水性ポリエーテルをベースとするセグメント化ポリウレタンでは、界面張力が極めて小さく、また表面の電位もほぼ0であり、水とされたPEGの溶解鎖が界面に凝縮された構造をとっている可能性が示唆され、血液適合性の発現が期待さ

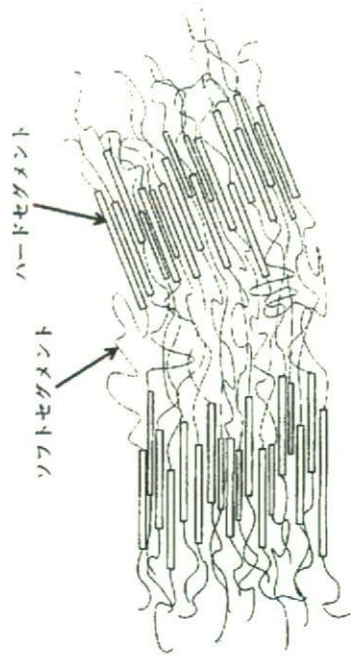


図4-11 セグメント化ポリウレタンのマイクロドメイン構造の模式図。

<sup>88</sup> エラストマー：非常に大きな弾性係数を持つ高分子材料の総称。天然ゴムを含むが、合成ゴムを指す場合が多い。



れた。

しかしながら、市販のSPUで実用に供されているのは、疎水性SPUである。それは、分子間凝集による強度保持のためには、疎水性プロックのほうが有利であるからである。上記の親水性SPUについては、表面とバルクにおける分子の局在をコントロールするのが困難なために、血液のような液体中では親水性プロックに水分が進入し、それが全体の強度を低下させることが問題となつていて、強度を必要としない部分へのSPUの使用は可能であるが、繰り返し荷重に対する耐久性が要求される人工心臓用ダイアフラム膜への応用に際しては、分子レベルでの改良が必要である。

SPUの研究は1980年代に数多く行われ、多種多様なSPUが一般用・工業用に使用された。生体用材料としては、SPUが人工血管用や人工心臓用として検討が続けられ、現在そのうちのいくつかが人工心臓用として用いられている。しかし、人工心臓の臨床現場では、抗血栓性および血液適合性のより高度な材料に対する要求は依然として高い。

#### 4.7.2 人工腎臓用および人工肺用材料(物質透過性材料)

人工腎臓には、種々の血中分子の選択的透過機能が求められる。人工肺には、気体の酸素と二酸化炭素の選択的透過機能が求められる。両者には、血液適合性も同時に必要である。

##### (1) 人工腎臓用材料

人工腎臓には、再生セルロース膜やポリスルフォネ膜が使用されている(表4-1参照)。再生セルロース膜の場合、抗血栓性の欠如と血中の免疫たんぱく質である補体の活性化とそれに伴う白血球減少が問題となっていた。しかし、表面の水酸基をマスキングすることで、これらの問題は解決できることが分かり、改良製品が開発された。現在広く用いられているポリスルフォネ膜の場合、補体活性化は起きないが、抗血栓性の不足の問題は依然として残っている。

人工腎臓による透析治療は救命という観点からは十分な効果をあげているが、今後はQOLの向上を目指した高機能人工腎臓の開発が望まれている。

不全患者は現在、週3回、1回当たり2時間ほどの透析時間が必要である。抗血液凝固剤であるヘパリンを静脈に注射するために、血液を体外に導くために、その都度穿刺する必要がある。十分な脱血量を得るために、太い注射針を使用するので、静脈が肥厚化し、注射ができなくなる。そのために、透析治療が長期化すると、血管の移植が必要になる。また、生体からは持続的に老廃物が産生されるので、週3回の透析では体調の維持が困難である。それで、持続透析に近い能力を持つ腹膜透析も開発されている。しかし、感染、事故、効率の経年劣化のような問題があるので、腹膜透析法は約10年間しか有効でない。

体内埋め込み型人工腎臓の開発が望まれているが、腎臓の高度な老廃物排泄と水分管理を実現できるシステムは概念設計にも至っていないのが現状である。水を能動的に分離・移動するようなシステム概念の構築がまず必要である。

##### (2) 人工肺用材料

人工肺の場合、膜自体の気体の選択的透過機能は非常に高く、現状以上の高度化は困難であるし、その必要もない。問題は、天然肺の毛細血管中を血液が流れる現象を人工肺を用いて実現できないことにある。そのために、埋め込み型の長期使用可能な人工肺は開発されていない。

天然肺は複雑な形状をしているので、非常に大きな表面積を有している。その表面近傍には毛細血管網が張り巡らされていて、ガス交換が行われている。現在の人工肺は中空糸膜を束ねた構造をしており、単位体積当たりの表面積で天然肺に及ばない。中空糸の口径を小さくして、表面積を増大させることも可能であるが、ある口径以下の中空糸内では血流への抵抗が増大し、通常の血管では流れなくなるが知られている。これに關して、材料表面と天然血管表面の違いのためである。毛細血管の柔軟性のためである。そのような仮説が立てられているが、この血流抵抗増大の原因はまだ明らかでない。また、細口径の中空糸内では血液凝固反応も昂進するために、素材自体に高い抗血栓性が必要である。これについても未解決である。



### 4.7.3 ドラッグデリバリー用材料

必要な時に/必要な場所へ/必要な量だけ、薬物を送り届けることを目的としたシステムを、ドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System: DDS) という (Appendix 1-3 参照)。薬の副作用の減少と適当量による高い治療効果を目指して、現在、DDS は世界的にも広く研究されている。DDS 用材料として、高分子材料が広く用いられている。DDS に求められる機能は、(1) ターゲティング能力、(2) 薬物保持能力、(3) 薬物放出制御能力、である (図 4-12)。

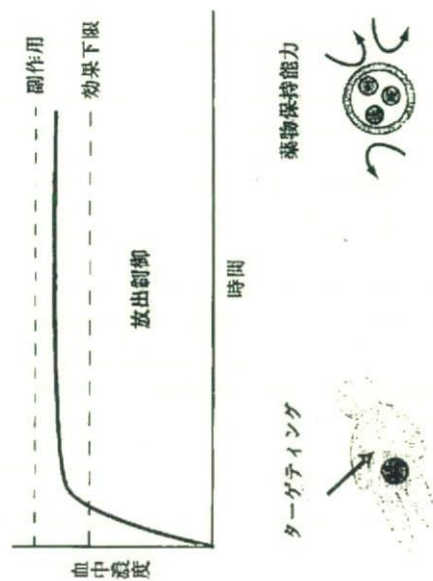


図 4-12 DDS の概念。

#### (1) ターゲティング能力

文字通り、薬を送り込みたい部位にだけ薬を集積させる能力のことである。実際には、患部に局所的に注射することが最も効果的である。しかし、肝臓のような体の奥深い臓器や脳への注射は危険を伴うので、それは困難である。このような場合、血液中に投与された薬が、標的の臓器に留まるようなシステムがあればよい。

DDS でもっとも多く研究されているのは、抗癌剤に関するものである。癌細胞

特有のマーカー分子を用いて、薬物の患部へのターゲティングが試みられている。しかし、癌細胞自体が多種多様である。マーカー分子の発現が一定でないマーカー分子に結合する化合物やたんぱく質 (抗体) の能力が低い、これらのために満足できる成果をあげていない。能動的に患部に到達できる機能が理想的であるが、現時点ではそれを実現する方法論の提唱もされていない。現在、最も有力な手段は、癌組織周囲の血管壁の透過性が高いことを利用した送達システムである。

#### (2) 薬物保持能力

薬物を失活させるような環境から守り、かつ薬物の最初の濃縮した状態を維持する能力のことである。血液中には種々の分解酵素や不必要な物質を結合して排除するたんぱく質があり、これらから薬物を守る必要がある。また、経口投与の場合には、胃酸 (pH 1~2) や胆汁・唾液 (約 pH 8) のような消化液の薬物への影響を制御する必要がある。薬物には大きく分けて脂溶性と水溶性の 2 種類がある。脂溶性の薬物は脂溶性の材料と混合しやすく、水溶性の薬物は親水性の材料と混合しやすい。

後に述べる薬物放出制御能力との兼ね合いで、DDS が薬物をより大量に保持できればよい、ということにはならない。通常、担体材料は薬物の物理化学特性に合わせて既存の高分子材料から選択される。複雑な薬物については、担体材料自体を開発する必要が生じることもある。

#### (3) 薬物放出制御能力

必要な時に/必要な場所/必要な量だけ、薬物を放出させる能力のことである。過去には薬物を徐々に放出する (徐放) 機能が注目を集めた。しかし、徐放の多くは薬物の拡散によるものであったために、思いどおりのパターンで放出させることは困難であった。特に、放出後に担体材料が分解することが望ましいとされて、生分解性高分子を用いた研究が多く行われた。ポリ乳酸を初めとする脂肪族系ポリエステルは大部分が疎水性 (脂溶性) であるために、これらの材料に担がれた脂溶性の薬物は水に対してほとんど溶解しない。それで放出

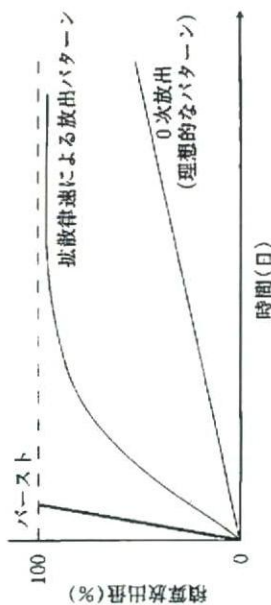


図 4-13 薬物放出のバクテレン。

が非常に遅い。また水溶性の薬物に用いた場合には、投与後直ちにほぼ全量が放出されてしまう(バースト現象)(図 4-13)。このような現象を改良するため、親水-疎水のバランスを調整する試みが行われている。さらに、希望したときに薬物を放出する機能の実現を目指して、温度変化や pH 変化によって物性を変化させる刺激応答性高分子を用いた研究が行われている。

#### 4.8 生体用高分子材料の生体安全性

バイオマテリアルの生物学的安全性評価としては、生体安全性(無毒性)と生体適合性の二つの観点がある。無毒性は最も重要な材料特性であり、すべての条件に優先する。これに関しては、法令やガイドラインで定められている。生体適合性に関しては、4.9 で述べる。

バイオマテリアルの多くは体内に埋め込んで、あるいは生体と接触して使用される。それらの材料は、使用に先立って、生体への影響を試験しなければならぬ。市販予定の金属・無機材料を含むバイオマテリアルは、決められた生物学的適合性試験に合格しないと、販売は認可されない。生体適合性試験法は、ASTM (American Society for Testing Materials) や ISO (International Organization for Standardization) で決められている。これらの試験法では、生体適合性という単語は無毒性と同じ意味で使用されている。

試験法としては、生体外(in vitro 試験管内)と生体内(in vivo)で評価する 2

種類の方法がある。

通常は、まず in vitro 試験から実施する。この試験法にはいくつかの試験法がある。その一つに、材料と細胞が直接接触した状態で、材料の毒性を試験する方法がある(Appendix 2-7 参照)。細胞毒性評価法の特徴は、単に簡便であるだけでなく、実際に細胞が材料に接触している状況を現しているモデルであるということにある。他の細胞毒性試験法には、材料を擬似液体液中で溶出させた後その抽出液を使った細胞毒性試験法、体内で材料からの溶出物を想定した試験による細胞毒性試験法、がある。

細胞毒性試験法は、細胞毒性・免疫系への刺激・慢性炎症の惹起・血液と血液成分への影響・変異原性と腫瘍形成を含む遺伝因子への効果、について検討するようデザインされている(2.8.2 参照)。一般に、カチオン性表面を持つ高分子材料表面では細胞の接着死・接着抑制・増殖抑制が観察される。カチオン性表面の毒性の原因は、細胞膜表面のたんぱく質や糖鎖と非常に強く相互作用するために細胞の生命活動が妨げられるため、といわれている。

in vitro 試験で毒性に問題がなかった材料については、次に in vivo 試験が必要である。動物を用いて、生体安全性と生体機能性を評価する。金属やセラミックスのような硬組織用バイオマテリアル(人工関節、人工骨など)を試験するには、試験に必要な十分量の緻密骨を得るために、イヌ・ヒツジ・ウサギのような比較的大型動物が必要になる。高分子のような軟組織用高分子材料(人工血管など)の場合、初期の埋入部位は通常皮下である。マウス・ネズミ・モットのような比較的小型動物が使用される。一定期間埋入後解剖して、材料周囲に形成された線維性カプセルの厚さや材料周辺組織における炎症の有無などが調査される。

動物とヒトは、種が異なる。それで、動物試験に特に問題がなかったら、次に臨床試験が必要になる。

#### 4.9 高分子材料の生体適合性

理想的な傷病の治療法とは、不具合になる前の状態に戻すことである。現在



の高分子系バイオマテリアルは、金属系バイオマテリアルやセラミックス系バイオマテリアルと同様に、医療に資するところは大きい。完全な治療を実現するには至っていない。それは、生体安全性や生体適合性の問題の解決が容易ではないからである(1.4.3参照)。

生体適合性の統一された定義は存在しない。定義の一つに、「必要とする期間、生体に悪影響を与えないこと、必要とする機能を発揮しながら、生体と共存できる材料の性質」がある。

表4-6に、高分子材料の特性と対応する用途を示す。生体適合性は、力学的適合性と界面的適合性に大きく分類できる。材料の非異物化のような化学的適合性は界面適合性に含める。力学的適合性は、材料全体のデザインと個々の材料の力学的特性に関係する性質である。界面的適合性は、材料表面とそれに接触する生体組織とのミクロあるいはナノレベルの界面現象に関係する性質である。この両者が満足されて初めて、生体適合性に優れた材料ということができる。

表4-6 高分子材料の特性と対応する用途。

特性	医療用材料
機械的強度	心臓弁、人工心臓膜、人工腱帯、人工腱
物質透過性	人工腎臓、人工肺、血漿分離膜
安定性	インプラント材料全般
光学的特性	コンタクトレンズ、眼内レンズ、人工角膜
表面特性	血液接触材料全般、インプラント材料全般
生分解性	結合糸

### 4.9.1 力学的適合性

体内に埋め込まれたバイオマテリアルは必ず周囲の生体組織に力学的刺激を与える。特に、骨や歯のような硬組織においては、材料からの力学的刺激に応じて骨組織の吸収と形成が起こる。そのために、材料選択とデザインを誤ると、バイオマテリアルが所期どおりの生体機能を長期間にわたって代行することとは不可能となる。人工股関節・人工膝関節・人工歯根・義歯床のような大きな繰り返し荷重のかかる医用機器では、力学的適合性が特に強く要求される。

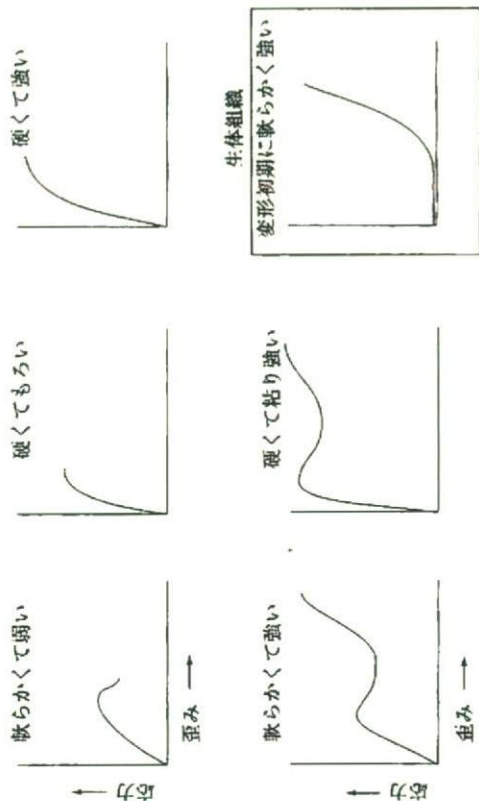


図4-14 合成高分子材料と生体組織の応力-変形曲線(模式図)の比較。

軟組織の治療用に用いられる高分子材料においても、力学的適合性はおろそかにできない。例えば、損傷した皮膚表面を被覆するための材料に必要なのは伸びのような軟らかさであるが、高分子材料の力学特性を天然皮膚の力学的特性に近づけることは容易ではない。

図4-14に模式図を示すように、天然皮膚や天然血管のような生体組織の初期弾性率は、合成ゴムに比較して非常に低い。いいかえると、生体組織には必ず力学的遊びが存在する。これは、生体組織がマトリックスと繊維の複合組織構造をとっているためと考えられる。このように、生体組織と生体用高分子材料とは応力-変形曲線が大きく異なるために、既存の高分子材料を皮膚創傷カバーとして使用できない。

人工気管・人工食道・人工血管などにおいても、宿主組織との力学的性質の同等性は重要である。これを実現するには、生体組織のような高次物理構造、つまり複合材料に関する活発な研究の推進を必要とする。

### 4.9.2 界面的適合性

材料の界面的適合性の評価では、力学的適合性の評価とは異なって、動物体内埋め込み試験や臨床応用試験の必要はない。そのために、これまでに界面的適合性に関しては、多くの *in vitro* での研究が積み重ねられてきた。

表 4-7 生体適合性の分類。

分類	内容	細目
バルクの	力学的整合性 デザインの適合性	
界面的	非刺激性 (非異物性)  非カプセル性 接着性	物理的非刺激性 補体非活性性 抗血栓性(=血液適合性)  硬組織接着性 軟組織接着性

界面的適合性は、表 4-7 に示すように非刺激性・非カプセル性・接着性の 3 種類に大別できる。この 3 種類の界面適合性に共通しているのは、材料表面と生体との分子の相互作用が決定的な役割を果たしていることである。ところが、材料の表面特性は後述するように千差万別であり、生体側の応答も多様である。そのために、界面的適合性には多額の研究費が投入されているにも関わらず、いまだに不明な点が多い。

金属やセラミックの材料表面は非常に硬く、ミクロな分子運動も制限されている。それに対して、高分子材料表面ははるかに軟らかく、ミクロな分子運動が可能である。また、金属やセラミックではプラズマ処理やエッチングによって消浄な表面をつくり出すことができるが、高分子材料表面はそのような処理に耐えきれない。

このように高分子材料は動的であるために、その表面の構造を明確にすることは、高性能分析機器を用いても容易ではない。バイオマテリアルは、使用中水分が材料周囲に必ず存在する。そのために、水と高分子の界面構造をあらかじめ

じめ知っておくことが必要である。この方面における研究の進展が待たれている。

生体は、水・低分子イオン・糖・アミノ酸・脂質・多糖類・たんぱく質・脂肪・細胞・生体組織のような物質の集合体である。したがって、材料が生体と接触したときまず起こる反応は、これらの生体成分との相互作用である。この中で材料の界面的適合性をほぼ決定しているのは、材料へのたんぱく質の吸着とそれに続いて起こる細胞接着であると考えられている(1.6 参照)。そのたんぱく質や細胞の中でも特に重要なのは、免疫系たんぱく質、血液凝固系たんぱく質、免疫系細胞、血小板、などであり、これらの物質は生体防衛を担当している。これらのことを踏まえて、材料表面に界面的適合性を付与しようという試みを紹介する。

#### (1) 材料表面の抗血栓性

体内に埋め込まれる材料は、免疫学的に生体がそれを異物と認識しないようにすること(非異物化)が必要である。そのためには、材料表面が生体組織や細胞に与える分子レベルの化学的刺激を防止することが必要になる。このような非異物性が材料表面に最も強く要求されるのは、材料が血液と接触する場合である。生体適合性に関して精力的に研究されたのは、材料表面で全く血栓を生成しない完全抗血栓性化表面をつくる研究である。現在研究されている抗血栓性表面は大きくは次の三つに分類できる。(a) 生理活性物質を利用する表面、(b) 血清アルブミンを選択的に吸着する表面、および、(c) 血漿たんぱく質を吸着しない表面、である。

##### (a) 生理活性物質を利用する表面

抗血栓のために用いられている生理活性物質は、ヘパリンもしくはウロキナーゼである。

ヘパリンは、血液凝固系において中心的な役割を果たすフィブリンの生成を阻止する硫酸基を有する多糖である。したがって、抗血栓性材料を得るには、ヘパリンを材料内部に包含させて血液中に徐放させるか、ヘパリンを材料表面に固定すればよい。ヘパリン徐放材料の欠点は、ある期間が過ぎればヘパリン



が枯渇するために長期間に渡る抗血栓性を期待するのが無理なこと／血小板の凝集をヘパリンが阻止できないこと、である。そこで、強いアニオン性のヘパリンとカチオン性の脂質とを混合した後、アニオン性とカチオン性の静電相互作用で複合化し、それで材料表面をコーティングする方法が開発された。このコーティングを施した表面は、長期にわたって抗血栓性を維持することが明らかとなり、人工肺へのコーティングが実用化されている。この方法の優れている点は、目的の人工臓器だけでなく、血液が流れる人工血管の内面すべてをコーティングできる点である。

一方、ウロキナーゼは、フィブリン溶解酵素のプラスミンがプラスミノゲンから生成するときに働く酵素であり、血栓を溶解する作用を有する。ウロキナーゼは共有結合によって材料表面に固定され、臨床で用いられている。ヘパリンは血栓形成を抑制し、ウロキナーゼは血栓を溶解する。作用機序が異なるこれら2種の生理活性物質は、それぞれ目的に応じて使い分けられている。

#### (b) 血清アルブミンを選択的に吸着する表面

血液中には100種類ほどのたんぱく質が含まれている。その中でもっとも含有量が多いのは血清アルブミンであり、血中濃度は35-55 mg/mlである。血液凝固に関して不活性なこのたんぱく質が変性しない状態で材料表面全体を被覆していれば、その上に他のたんぱく質が吸着することも、あるいは血小板が粘着することもない。実際にあらかじめ材料表面に血清アルブミンを吸着させておくと、細胞はその表面にほとんど接せず、血清アルブミン未吸着の材料表面とは大きな相違がある。しかし、現実には、あらかじめアルブミンを吸着させておいても時間とともに他のたんぱく質による吸着置換が起こるために、良好な成績は得られにくい。

ところが、アルブミンを積極的に吸着し、しかも他のたんぱく質によって吸着置換されにくい表面が開発された<sup>14)</sup>。それらは、アルブミン分子が脂肪酸を運搬するための疎水性ポケットを持っていることに着目し、脂肪酸を材料表面に化学結合させることによって固定する方法である。炭素数が16から18の炭化水素鎖で表面をアルキル化した場合に良好な結果が得られている。

#### (c) 血漿たんぱく質を吸着しない表面

あらゆるたんぱく質を常に吸着しないような材料が存在するならば、それは抗血栓性材料となるはずである。通常の材料表面に血液が接触すると、血漿たんぱく質が直ちに吸着する。それは、血液と材料との間に表面自由エネルギーのギャップが存在するからである。水中にある材料の表面へたんぱく質のような物質が吸着したときの接着(吸着)仕事を計算すると、疎水性が非常に高い表面、あるいは逆に親水性が非常に高い表面を有する材料が、たんぱく質の吸着しにくい材料という結果が得られている。実際に、解離基を含まない均一平滑表面を有する種々の高分子材料に免疫たんぱく質のIgG<sup>15)</sup>を吸着させたときの水接触角を図4-15に、線維芽細胞を培養したときの細胞接着数と接触角との

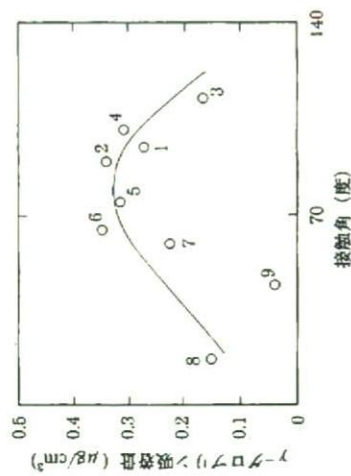


図4-15 種々の高分子材料の対水接触角とγグロブリンの吸着。

1. ポリエチレン, 2. ポリプロピレン, 3. ポリテトラフルオロエチレン, 4. シリコン, 5. ポリスチレン, 6. ポリエチレンテトラフルレート, 7. ビニルアルコール-エチレン共重合体, 8. セルロース, 9. ポリビニルアルコール。

<sup>15)</sup> IgG: 免疫を担当するたんぱく質である抗体の一種。抗体は、免疫グロブリン (Immunoglobulin) と呼ばれる。リンパ球のB細胞が産生する糖たんぱく質で、特定の分子(抗原)を認識して結合する働きを持つ。抗体は、構造の違いにより、IgG, IgA, IgM, IgD, IgEの5種類のクラスに分類される。このうち、IgGはヒトでは免疫グロブリンの70%以上を占め、血漿中に最も多い抗体である。分子量は約15万。



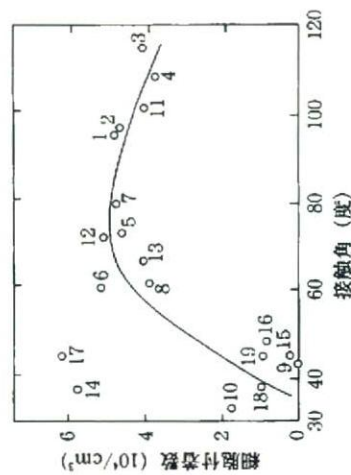


図 4-16 種々の高分子材料の対水接触角と線維芽細胞の接着数との関係。

1. ポリエチレン, 2. ポリプロピレン, 3. ポリテトラフルオロエチレン, 4. テトラフルオロエチレン-ヘキサフルオロプロピレン共重合体, 5. ポリエチレンテレフタレート, 6. ポリメチルメタクリレート, 7. ナイロン-6, 8. ビニルアルコール-エチレン共重合体, 9. ポリビニルアルコール, 10. セルロース, 11. シリコン, 12. ポリスチレン, 13. 市販培養皿, 14. ガラス, 15. ポリアクリルアミドグラフト化ポリエチレン, 16. ポリアクリル酸グラフト化ポリエチレン, 17. フィブロンキチングラフト化ポリエチレン, 18. コラーゲングラフト化ポリエチレン, 19. BSA グラフト化ポリエチレン。

関係を図 4-16 に示す。これらの図より、接触角が約 70° の材料表面に最も多くのたんぱく質が吸着するとともに細胞もよく接着して増殖すること、逆に親水性や疎水性の高い表面ではたんぱく質の吸着や細胞の接着が少なくなることが分かる。

現在のところ、シリコンやフッ素系高分子より高い疎水性を持つ材料は存在しない。一方、高親水性表面としてよく知られている高分子材料は、含水層体であるポリ HEMA (図 4-1 参照) であるが、これはたんぱく質の吸着を完全に抑制できるほどの高い親水性を示さない。そこで、従来にはない、図 4-17 に示すような構造の親水性表面を有する材料が開発研究されている<sup>10)</sup>。その一つが水溶性モノマーの表面グラフト重合体である。たんぱく質を吸着するような疎水性の固相表面 (図 4-17(c) 参照) を親水性に改質する方法として、水溶性高分子を表面に結合する方法がある。表面に高分子鎖が枝付け (グラフト)

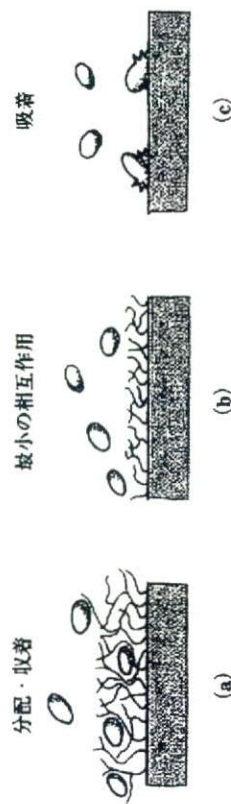


図 4-17 グラフト表面とパライオコロイドとの相互作用様式。

- (a) グラフト量の多い表面, (b) 適度の水溶性グラフト鎖を持つ表面, (c) 固相表面。

されているように見えるために、表面グラフト法と呼ばれている。表面グラフト用親水性モノマーとしては、ゼロ界面自由エネルギーに限りなく近づけるといふ考えから非イオン性のものが用いられている。しかし、水溶性鎖の密度が高くすぎると、血液たんぱく質が表面から内部層にまで侵入して数多く吸着 (図 4-17(a) 参照) し、血液凝固の活性化の機会が高くなる。結局、たんぱく質の吸着を生じない表面は、図 4-17(b) に示したように、適度の水溶性鎖を持つ表面ということになる。図 4-15 と図 4-16 において 9 番のポリビニルアルコールが最小の生体成分接着を示したのは、このポリビニルアルコール表面そのものが、図 4-17(b) のような構造をしているためと思われる。これらの結果を基にして、新しい技術が開発された<sup>10)</sup>。

水溶性鎖の密度を極限まで高めると、分子同士の排除体積効果<sup>10)</sup>が働き、

<sup>10)</sup> 排除体積効果: すべての原子・分子は、それが存在することによって、周りの原子・分子が入り込めない空間 (排除体積) を実現する。小さな分子と異なり、高分子の原子は鎖状に結合しており、個々の結合の回転・伸縮・移動に大きな制約がかかる。このために、高分子は、それを構成する原子の排除体積よりも数段大きな排除体積を有する。溶液中に孤立している高分子鎖は最大の排除体積を有するが、濃度が上昇すると互いを排除しようとして、その形態に相互に影響を与え、このために高分子溶液の粘度が上昇したり、浸透圧が生じたりする。濃厚ブラシ表面の場合には、リビング重合反応が表面から開始し、互いに排除しようとする排除体積効果により、ブラシが伸びてゆくように反応が進んで、高密度なブラシ表面を与える。



表面から外界に向けてグラフト鎖が引き延ばされた構造をとるようになる。この状態を、濃厚ブラシと呼ぶ。濃厚ブラシ環境下では、高分子鎖は極限まで引き延ばされるほど高密度に密集するために、たんばく質が分子鎖の間隙に侵入することができない。この濃厚ブラシをたんばく質と相互作用の小さい高分子で構築すれば、たんばく質との相互作用が非常に小さい表面が得られると期待される。このような濃厚ブラシ表面がリビングラジカル重合を用いて作製された。たんばく質吸着量を調べたところ、質量が $1\text{cm}^2$ 当たり $\text{ng}$ (ナノグラム)の精度で測定できる特殊な装置の測定限界以下の吸着量しか示さなかった。すなわち、上記の仮説が実証されたと考えられる<sup>(9)</sup>。

## (2) 非カプセル化

材料を体内に埋め込むと、一般に材料表面に結合した生体組織によるカプセル化(1.4.3 参照)が起こる。カプセル化した組織が厚くなると、材料表面と生体組織の界面に必要とする接着強度が得られなくなる。そのために、カプセル化しない材料表面の開発が囑望されている。材料の表面が周囲の生体組織に強い刺激を与え続けると、カプセルは厚くなる。それで、カプセルの厚さを薄くするために、刺激をできるだけ弱めなければならぬと考えられている。生体に対する刺激は水が最も弱いので、高含水率表面を持つ高分子材料がカプセルを生成しにくくすると考えられている。

## (3) 生体組織接着性

上記のカプセル化組織と材料とは完全には接着しておらず、むしろその間には血管が入り込みない隙間である死腔さえ存在する。このような感染の原因となる死腔を生成させずに、生体組織と材料をしっかりと接着させるのも生体組織接着性の問題に帰する(1.6 参照)。

材料表面にコーラーゲンあるいは骨成分である水酸アパタイトを固定すると、材料表面とそれに接触している生体組織とが強力に接着する可能性が高い。さらに、生体のコーラーゲン分子は線維芽細胞から産生されるので、コーラーゲン産生が促進されるように線維芽細胞がよく付着できることも材料表面にとって必

要である。実際に、細胞接着に重要な役割を果たしているフィブロネクチンやコラーゲンを表面に固定した材料を動物に埋め込むと、材料表面と生体組織はしっかりと接着しており、両者間には死腔は存在しない。

## 4.10 将来への展開

バイオマテリアルとしての高分子材料は、今後、ますます重要性を増して行く。その理出は、人工臓器・DDS・再生医療・ナノメディスンのような新しい医療技術のコンセンプトが次々に提案されてきており、それらを具体化する技術の一翼を高分子材料が担う場が増加しているからである。高分子材料には多彩な分子種があるために、新規な技術からの要請に迅速に対応できることがある。また、材料自体の機能の向上だけではなく、加工技術・成形技術・表面修饰技術・複合化技術のような周辺技術も進歩している。これらが相補的に高分子材料の全体的技術を進歩させ、その結果、バイオマテリアルとしての高分子の使用は显的に増加しそして多様化している。

将来的には、高分子材料に対して、下記の発展が期待されている。

- (a) 2種類の刺激に対する応答のような、より高次の機能の発現
- (b) 生体からエネルギーを得て仕事をすすめる機能の発現
- (c) 肺や肝臓のような生体部位の超複雑構造を再現するための成型法の開発
- (d) 廃棄物の処理コストのかかるポリ塩化ビニルの代替品の開発



## 第4章 参考書

- (1) 伊勢典夫 他：新高分子化学序論，化学同人 (1995)
- (2) 筏義人 他：高分子事典，高分子刊行会 (1971)
- (3) 高分子学会 編：医療機能材料，共立出版 (1990)
- (4) 筏義人：バイオマテリアル，日刊工業新聞社 (1988)
- (5) 中林宣男 他：バイオマテリアル，コロナ社 (1999)
- (6) 石原一彦 他：バイオマテリアルサイエンス，東京化学同人 (2003)
- (7) 筏義人：生体材料学，産業図書 (1994)
- (8) 松田武久：医用高分子材料，生体コロイドⅡ (嶋林三郎 他編)，廣川書店 (1990)
- (9) 瀬崎仁 編：ドラッグデリバリーシステム，南江堂 (1986)
- (10) Williams, D. F.: Definitions in Biomaterials, Elsevier, Amsterdam (1987)
- (11) Boss, J. L.: Biomaterials and Bioengineering Handbook (ed. Wise, D. L.), Marcel Dekker, Inc., New York (2000)
- (12) 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイドライン 1995 解説 (厚生省薬務局医療機器開発課監修)，薬事日報社 (1996)

## 第4章 引用文献

- (1) Eberhart, R. C., Munro, M. S., Williams, G. B., Kuikarni, P. V., Shannon, W. A. Jr., Brink, B. E. and Fry, W. J.: Albumin adsorption and retention on C18-alkylderivatized polyurethane vascular grafts. *Artif Organs*, **11** (5) : 375-82 (1987)
- (2) Ikada, Y.: Surface modification of polymers for medical applications. *Biomaterials*, **15**(10) (1994)
- (3) Yoshikawa, C., Goto, A., Tsujii, Y., Fukuda, T., Kimura, T., Yamamoto, K. and Kishida, A.: Protein repellency of well-defined, concentrated poly (2-hydroxyethyl methacrylate) brushes by the size-exclusion effect. *Macromolecules*, **39** (2006) 2284-2290



材料学シリーズ 監修者

堂山昌男

東京大学名誉教授

帝京科学大学名誉教授

Ph. D., 工学博士

小川恵一

横浜市中央図書館館長

元横浜市立大学学長

Ph. D.

北田正弘

東京芸術大学教授

工学博士

編者

田中順三(たなか じゅんぞう)

東京工業大学大学院理工学研究

科 教授

工学博士

角田 方衛(すみた まさえ)

前シンガポール国立大学バイオ

工学領域 客員教授

工学博士

立石 哲也(たていし てつや)

物質・材料研究機構 生体材料

センター 名誉フェロー

工学博士

著者

角田 方衛

同上 (第1章、第2章)

岡 隆夫(はなわ たかお)

東京医科歯科大学 生体材料工

学研究所 教授

工学博士、博士(工学) (第2章)

大槻 主税(おおつき ちから)

名古屋大学大学院工学研究科

教授

工学博士 (第3章)

岸田 品夫(きしだ あきお)

東京医科歯科大学 生体材料工

学研究所 教授

工学博士 (第4章)

谷口 彰良(たにぐち あきよし)

物質・材料研究機構 生体材料

センター グループリーダー

博士(工学) (第5章)

菊池 正紀(きくち まさのり)

物質・材料研究機構 生体材料

センター グループリーダー

博士(工学) (第6章)

校印省略

2008年7月25日 第1版発行

材料学シリーズ

バイオマテリアル

材料と生体の相互作用

編者 © 出 中 順 三  
角 立 行 衛  
内 田 哲 也  
印刷者 山 岡 景 仁

発行所 株式会社 内田老鶴堂

〒112-0012 東京都文京区大塚3丁目34番3号

電話 (03) 3945-6781(代)・FAX (03) 3945-6782

印刷・製本/三栄印刷 K. K.

Published by UCHIDA ROKAKUHO PUBLISHING CO., LTD.

3-34-3 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

U. R. No. 565-1

ISBN 978-4-7536-5633-2 C3042



# バイオマテリアル

## 材料と生体の相互作用

田中順三・角田方衛・立石哲也 編  
 角田方衛・埴 隆夫・大槻主税 著  
 岸田晶夫・谷口彰良・菊池正紀

A5判・264頁・定価3990円(本体3800円)  
 ISBN978-4-7536-5633-2

人間の体内という厳しい環境下で安全に、持続的にある機能、部位を代替することが求められるのがバイオマテリアル(生体材料)である。バイオマテリアルの理解には材料の3要素である金属材料、セラミック材料、高分子材料の理解はもちろん、生体側の医学、遺伝子工学、細胞工学、再生医療に関する基礎知識も欠かせない。本書は、この広大な学際領域を平易に記述し、どの分野の学習者が読んでもバイオマテリアルの全体感が掴めるように執筆されたものである。

材料を、人体との相互作用を軸にわかりやすく体系付け、バイオマテリアルとしての本質を把握できるようにするため、論理的かつできるだけ平易な短い文章で記述し、数式はできるだけ使わない、式を使う場合はその物理化学的意味を明確にする、専門用語の使用はできるだけ避けるがやむをえず使用する場合は脚注などで説明する、など数々の工夫を凝らしたテキストである。

### 内容目

#### 第1章 バイオマテリアルの概念

- 1.1 バイオマテリアルの定義
- 1.2 バイオマテリアルの種類と分類
- 1.3 材料の性質
- 1.4 体内環境
- 1.5 バイオマテリアルに求められる特性
- 1.6 バイオマテリアルと生体組織との界面
- 1.7 新しいバイオマテリアル
- 1.8 各章の概要

Appendix 破壊靱性/バイオセンサ/DDS(ドラッグ・デリバリー・システム)

#### 第2章 金属系バイオマテリアル

- 2.1 金属の特徴
- 2.2 バイオマテリアルとしての金属の歴史
- 2.3 金属系バイオマテリアルの用途と種類
- 2.4 生体用金属材料
- 2.5 金属材料の内部構造—組織と強度
- 2.6 金属系バイオマテリアルの腐食と耐食機構
- 2.7 金属系バイオマテリアルの耐久性
- 2.8 金属材料の安全性
- 2.9 生体適合性に優れているチタン系材料
- 2.10 新しい生体用金属材料

Appendix 応力と変形/金属の結晶構造

造/形状記憶と超弾性/平衡状態図/双晶変形/腐食の電気化学の基礎/細胞毒性

#### 第3章 セラミック系バイオマテリアル

- 3.1 セラミックとは何か
- 3.2 セラミックの特徴
- 3.3 バイオマテリアルとしてのセラミックの歴史
- 3.4 骨や関節を修復するためのセラミック
- 3.5 歯科用セラミック
- 3.6 セラミックの金属材料基板へのコーティング
- 3.7 癌治療用セラミック
- 3.8 将来への展開

Appendix シリカガラスと実用ガラス/水酸アパタイトのコーティング法

#### 第4章 生体用高分子材料

- 4.1 高分子材料の定義
- 4.2 高分子の分類
- 4.3 高分子の呼称法
- 4.4 日常生活に密着している高分子材料
- 4.5 初期の生体用高分子材料
- 4.6 高分子材料の基礎

- 4.7 生体用高分子材料の応用例
- 4.8 生体用高分子材料の生体安全性
- 4.9 高分子材料の生体適合性
- 4.10 将来への展開

#### 第5章 材料工学者のための遺伝子工学と細胞工学

- 5.1 知っておきたい遺伝子工学の基礎
- 5.2 知っておきたい細胞工学の基礎
- 5.3 遺伝子工学と細胞工学を用いた材料研究

#### 第6章 再生医療の足場材料とナノテクノロジー

- 6.1 再生医療とは何か
- 6.2 体組織とバイオマテリアルの違い
- 6.3 足場材料に求められる特性
- 6.4 ナノテクノロジーの足場材料製法への応用
- 6.5 再生医療の現状と将来

Appendix iPS細胞

#### 注文書

	定価(税込)	部数
バイオマテリアル	3990円	

お名前

おところ

〒

TEL ( )

表示の価格は税込定価(本体価格+税5%)です。

(株)内田老鶴圃

〒112-0012 東京都文京区大塚3-34-3  
 TEL 03-3945-6781 FAX 03-3945-6782



ORIGINAL ARTICLE

Kwangwoo Nam, PhD · Ayako Murakoshi, MMS  
Tsuyoshi Kimura, PhD · Toshiya Fujisato, PhD  
Soichiro Kitamura, MD · Akio Kishida, PhD

## Study on the physical properties of tissue-engineered blood vessels made by chemical cross-linking and polymer–tissue cross-linking

**Abstract** In this study, we attempted to chemically cross-link decellularized blood vessel tissue and to perform cross-linking with a polymer in order to control its stability and functionalization. For this purpose, we cross-linked tissue by intrahelical, interhelical, and intermolecular cross-linking between the polymer and the collagen helix, which is a component of the native tissue. The intrahelically cross-linked tissue showed weaker stability against heat and degradation caused by collagenase compared to the interhelically cross-linked tissue. The tissue intermolecularly cross-linked with polymer showed the highest stability against heat and degradation caused by collagenase. The mechanical strength test showed that the Young's moduli were different for the intra/interhelically and intermolecularly cross-linked tissues, with the latter being stiffer. This is thought to be because the cross-linked polymer functions in the same way as elastin, whereas simple collagen cross-linking provides a supportive matrix that holds the collagen and elastin together.

**Key words** Tissue engineering · Cross-linking · Decellularization · Phospholipid polymer

### Introduction

Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences to the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function.<sup>1</sup> Researchers involved with tissue engineering investigate the application of various natural and synthetic polymeric materials to the construction of extracellular matrices for in vitro cell culture and in vivo tissue regeneration. However, all approaches to mimicking native extracellular matrix reported to date require further improvements due to the inappropriateness of the materials used to construct the matrices and the lack of adequate matrix proteins.<sup>2</sup> Therefore, native tissues have been proposed for use as biomaterials that can be applied to tissue engineering.

There are two main methods for processing native tissue in tissue engineering. The first method is tissue cross-linking, which is one of the most common methods used in the field of tissue engineering. A popularly used method of this type is glutaraldehyde cross-linking.<sup>3–5</sup> Tissue cross-linking may improve the stability of the tissue and reduce collagen immunogenicity. It is also possible to functionalize the tissue by using specific cross-linkers or by cross-linking the tissue with polymers with specific properties. Tissue cross-linking is critical from the viewpoint of toxicity. Many researchers are working on the suppression of toxicity by using diverse types of cross-linkers,<sup>6–8</sup> but they are as yet unable to control aspects of tissue behavior such as the degradation time or the encapsulation of the tissue in vivo. Furthermore, the choice of polymer should also be carefully considered, because the polymer could result in side effects.

The second main method used in tissue engineering is decellularization, which can be carried out in various ways, e.g., acid or alkaline treatment, detergent treatment, enzymatic digestion, and high pressurization.<sup>9–16</sup> This method is promising when a base material that has the same structure as that of the extracellular matrix can be created, and tailored remodeling, especially using a patient's cells, is

Received: May 14, 2008 / Accepted: November 27, 2008

K. Nam · A. Murakoshi · T. Kimura · A. Kishida (✉)  
Division of Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials  
and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,  
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan  
Tel. +81-3-5841-8028; Fax +81-3-5841-8028  
e-mail: kishida.fm@tmd.ac.jp

K. Nam · T. Kimura · A. Kishida  
JST-CREST, Kawaguchi, Saitama, Japan

T. Fujisato  
Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of  
Technology, Osaka, Japan

S. Kitamura  
National Cardiovascular Center, Osaka, Japan



possible by this method. However, this method can also cause certain problems. The cell debris remaining after chemical treatment for decellularization can be toxic or cause calcification. Furthermore, the collagen structure of the tissue may be disrupted during chemical treatment, and the decellularized tissue can cause problems such as thrombosis, calcification, and neointimal hyperplasia.<sup>14,17</sup>

Thus far, we have studied the preparation and characterization of the collagen structure.<sup>18–20</sup> Using various cross-linkers, we found that cross-linking the collagen structure changes the physical and biological properties of collagen. Furthermore, it is possible to functionalize collagen specifically when it is cross-linked with a specific polymer. Biological behaviors such as cell adhesivity could be altered by polymer immobilization on the surface of the collagen structure.<sup>19</sup> It is also possible to control the cross-linking rate, which may lead to changes in the properties of the collagen structure.

Based on our previous experience, we applied the cross-linking of the collagen structure to tissue cross-linking using various cross-linkers. For this study, we used decellularized tissue prepared by ultrahigh pressure.<sup>15,16</sup> This method is advantageous from the aspect that tissue free of chemicals and cell debris can be prepared with nondisrupted collagen fibrils in the tissue. This made it easier for us to evaluate the effect of cross-linking. We chose *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) for carboxyl–amine cross-linking; 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) for carboxyl–carboxyl cross-linking; and glutaraldehyde for amine–amine cross-linking. EDC and NHS induce intrahelical cross-linking, and BDDGE and glutaraldehyde cause interhelical cross-linking. In order to cross-link the tissue with a polymer intermolecularly, we chose 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer, which is known for its antithrombogenic and anticalcification properties.<sup>21–25</sup> MPC polymer was cross-linked with the tissue using EDC and NHS. With the decellularized tissue and the cross-linked tissues, we characterized the stability toward heat, biostability, and mechanical strength.

## Materials and methods

### Materials

Porcine abdominal blood vessels were purchased from a local abattoir (Tokyo Shibaura Zoki, Tokyo, Japan). EDC; NHS; BDDGE; methacrylic acid (MA); glutaraldehyde; 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS); and toluidine blue O (TBO) were purchased from Wako (Osaka, Japan) and were used without further purification. Collagenase from *Clostridiopeptidase histolyticum* (EC 3.4.24.3) was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Calcium chloride, sodium azide, and NaHCO<sub>3</sub> were purchased from Kanto Chemicals (Tokyo, Japan). 2-(*N*-Morpholino)ethane sulfonic acid (MES) was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). MPC was provided by Professor Kazuhiko Ishihara of the University of Tokyo.

### Preparation of cross-linked tissue

#### Synthesis of polymer

Poly[MPC-*co*-methacrylic acid (MA)] (PMA) was synthesized according to a previously published method.<sup>18</sup> In brief, MPC and methacrylic acid were polymerized in ethanol solution using 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN) as an initiator. Polymerization was carried out for 16 h at 60°C. The solution was precipitated into diethyl ether, freeze-dried, and stored in vacuo until further use. The molar ratio of PMA in this study was MPC:MA = 3:7 (Mn = 3 × 10<sup>5</sup>).

#### Blood vessel decellularization

The decellularization process was executed as reported elsewhere.<sup>15,16</sup> In short, a blood vessel (length: 5 cm, diameter: 1.3 cm) was inserted into a vinyl bag filled with Phosphate buffered saline (PBS). Then the blood vessel was pressurized at 10 000 atm for 15 min (25°C) to dismantle the cells. It was then washed by continuous shaking in an EBM-2 medium containing DNase I (0.2 mg/ml) and antibiotics at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, 95% air for 72 h to eliminate cells debris completely and to prepare a decellularized blood vessel. To avoid confusion, we will refer to the decellularized blood vessel as *D*-tissue.

#### Cross-linking of decellularized blood vessel

To create carboxyl–amine group intrahelical cross-links, EDC/NHS was used as the cross-linker in an ethanol/water cosolvent (30% v/v). EDC (70 mM) and NHS (70 mM) was added to an ethanol/water co-solvent. Then *D*-tissue was added to the solution. The *D*-tissue was cross-linked for 24 h at 4°C. Then the cross-linked tissue was taken out and washed with distilled water for 1 day to obtain a carboxyl–amine group intrahelical cross-linked tissue named *E*-tissue.

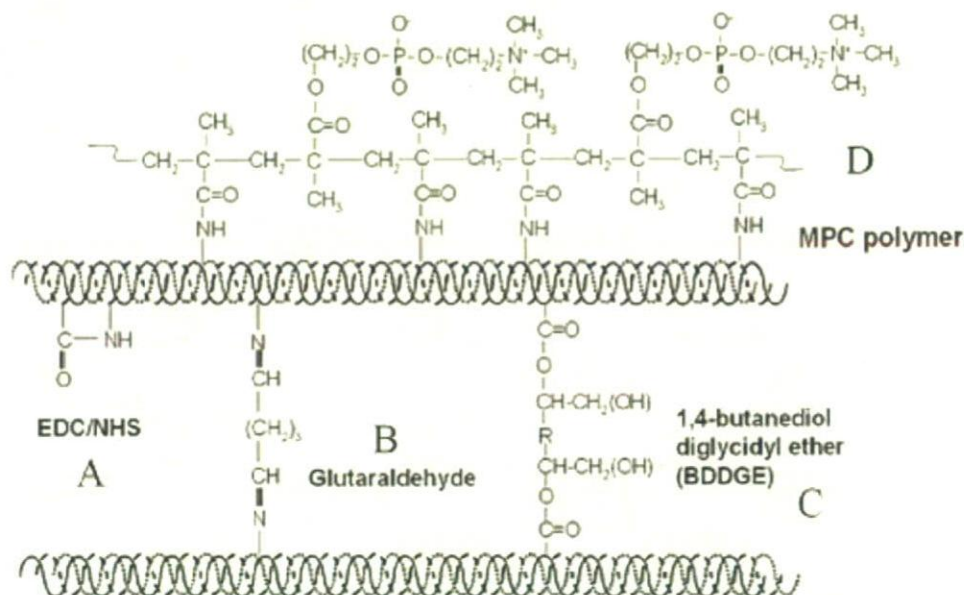
Carboxyl–carboxyl group interhelical cross-linking was performed using BDDGE. For this, the method proposed by Zeeman et al. was used.<sup>26</sup> In brief, 4 wt% BDDGE solution was buffered with 0.05 M MES at pH 4.5. Cross-linking of *D*-tissue was performed at room temperature for 5 days. Next the sample was rinsed with water for 1 day to prepare a BDDGE cross-linked tissue (*B*-tissue) using BDDGE.

Amine–amine group interhelical cross-linking was carried out using glutaraldehyde as the cross-linker. *D*-tissue was immersed in a glutaraldehyde/PBS solution and it was cross-linked for 3 h at room temperature. After cross-linking of the *D*-tissue, the sample was first rinsed with water for 30 min and then in 4 M NaCl for 2 h. In order to eliminate NaCl, the sample was rinsed with distilled water for 1 day to yield a glutaraldehyde cross-linked tissue (*G*-tissue).

To prepare a polymer-cross-linked tissue, PMA was added to the ethanol/water cosolvent (30% v/v) along with EDC and NHS and was activated for 10 min. The molar ratio of each chemical was fixed; the ratio of EDC:NHS:collagen–carboxylic acid groups of PMA was 10:10:1. *D*-



**Fig. 1.** Schematic of the cross-linking in the tissue. *A*, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) cross-linked tissue (*E*-tissue); *B*, glutaraldehyde cross-linked tissue (*G*-tissue); *C*, 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) cross-linked tissue (*B*-tissue); *D*, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-immobilized tissue (*M*-tissue)



**Table 1.** Nomenclature of the tissues used in this study

Tissue type	Cross-linker	Cross-linked functional groups	Type of cross-linking
<i>D</i> -tissue	None	None	None
<i>E</i> -tissue	EDC/NHS	Carboxyl-amine groups	Intrahelical
<i>B</i> -tissue	BDDGE	Carboxyl-carboxyl groups	Interhelical
<i>G</i> -tissue	Glutaraldehyde	Amine-amine groups	Interhelical
<i>M</i> -tissue	EDC/NHS-MPC polymer	Carboxyl-amine groups	Intermolecular (helix-polymer)

EDC, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; BDDGE, 1,4-butanediol diglycidyl ether; MPC, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine

tissue was added to the PMA-containing solution and was reacted for 24 h at 4°C. Subsequently, the gel was first washed for 1 day to prepare a salt-free PMA cross-linked tissue (*M*-tissue). A schematic depiction of the cross-linking is shown at Fig. 1 and the nomenclature and features are listed in Table 1.

## Characterization of tissues

### Determination of functional groups

Determination of the unreacted carboxyl groups after the cross-linking procedure was carried out using TBO.<sup>27</sup> A total of 10 mg of each tissue was incubated in 30 ml of TBO solution (pH 10) of a given concentration under stirring at 20°C for 24 h. The tissues were then removed from the solution and rinsed in NaOH solution (pH 10) for 10 min under stirring to remove the free TBO. Next, the tissues were immersed in 50% acetic acid to completely dissolve the captured TBO to give a blue solution. The amount of TBO solution was detected using a UV spectrophotometer (V-560, Jasco, Tokyo, Japan) at 620 nm and the amount of actual TBO was calculated using calibration data measured from known TBO concentrations.

The concentration of the primary amine groups in the tissue samples was determined using TNBS.<sup>28,29</sup> A total of 10 mg of each tissue was placed in a 4 wt% aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. After 1 h, 0.5 wt% aqueous TNBS solution was added and the reaction was allowed to proceed for 2 h at 40°C. Then, the samples were rinsed with saline solution. Subsequent to freeze-drying overnight, the dry mass of the sample was determined. The dry samples were immersed in 2 ml of 6 M aqueous HCl until they dissolved completely. The resultant solution was subsequently diluted with distilled water (8 ml) and the absorbance was measured at 345 nm.

### Shrinkage on heat treatment

Samples with a known diameter ( $d = 1$  cm) were immersed in water and placed in a heat oven (80°C) for 1 day or 1 week. The change in the diameter was determined to characterize the shrinkage of the tissue.

### Enzymatic degradation test

Degradation tests of the samples were carried out using collagenase (activity: 300 units/mg). First, 50-mg tissue samples were lyophilized for 1 day or 1 week and the lyophi-



lized tissue was placed in water for 3 days to enable it to rehydrate. Next, the tissue was immersed in 2 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) with  $5 \times 10^{-3}$  M of calcium chloride and  $8 \times 10^{-4}$  M of sodium azide and shaken for 3 h at 37°C. Then, 2 ml of collagenase Tris-HCl buffer solution was added to the solution containing the tissue. The total concentration of the collagenase was 100 units/ml. The container was returned to the shaking water bath. After 1 day, the samples were taken out and washed with sufficient water before lyophilization. After lyophilization, the samples were weighed to calculate the change in the weight of the tissue:

$$\text{Weight change (\%)} = 100 \times (\text{BDDW} - \text{ADDW}) / \text{BDDW} \quad (1)$$

Here, BDDW indicates the dry weight before degradation and ADDW indicates that after degradation. The same procedure was repeated for samples that underwent the collagenase reaction for 1 week. The collagenase solution was changed every day to maintain its activity.

#### Mechanical properties

The stress-strain curves of the respective tissues were determined by uniaxial measurements using a universal testing machine (Yamaden Rheoner II, Tokyo, Japan). A decellularized vessel with an average thickness of 3 mm was chosen. The samples were prepared by cutting them to a size of  $40 \times 10$  mm both parallel (longitudinal) and perpendicular (circumferential) to the direction of blood flow. The samples were clamped to the holder of the testing machine to set them to the desired length (distance between jigs: 15–20 mm). Each sample was strained at a rate of 10 mm/min at  $20 \text{ N/m}^2$ . The data obtained were fitted to the stress-strain curves of the samples, and the Young's moduli for the low stress–low strain (elastin phase) and high stress–high strain ranges (collagen phase) were calculated.<sup>16,30,31</sup>

#### Statistical analysis

All experiments were repeated at least five times and the values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance using Origin 6.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA) with the significance level set at  $P < 0.05$ .

## Results and discussion

After cross-linking, the color of the tissues remained unchanged in all cases except for the *G*-tissue, which turned yellow after the reaction. The density of unreacted carboxyl groups and the concentration of unreacted amine groups after the cross-linking varied as shown in Fig. 2. For *E*-tissue and *M*-tissue, both unreacted carboxyl and amine groups decreased. This is because of the consumption of the free carboxyl group and amine groups to form an amide bond in the fibrous proteins in the cross-linking process. *G*-tissue

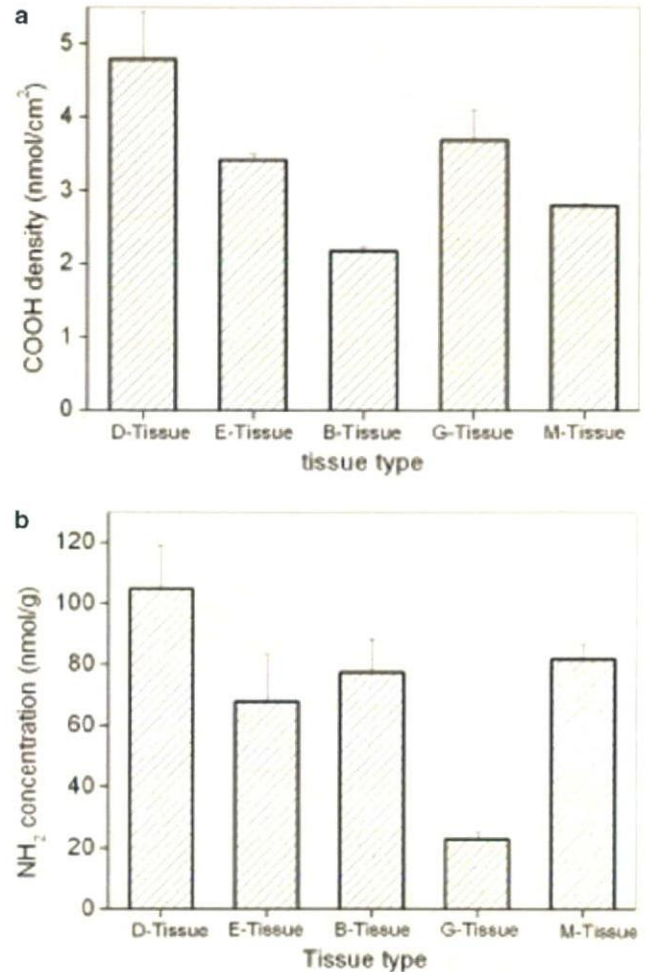


Fig. 2. COOH density (a) and  $\text{NH}_2$  concentration (b) for the various tissues. *D*-tissue, decellularized tissue

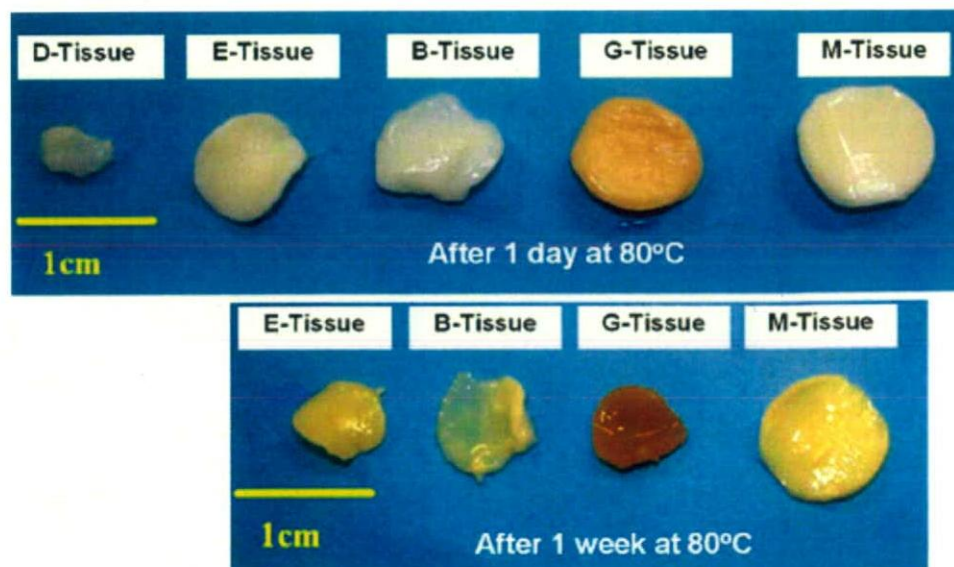
showed a low level of amine groups only and *B*-tissue showed a low level of carboxyl groups only. As mentioned in the Materials and methods section, glutaraldehyde and BDDGE consume only amine groups and carboxyl groups, respectively. We are not yet sure whether cross-linking occurred for both collagen and elastin. This is discussed in a subsequent section.

#### Deformation of tissues by external stimuli

The stability of the tissues was characterized by heating them in water. As shown in Fig. 3, *D*-tissue showed a decrease in volume after 1 day of heating. However, there was no significant decrease in diameter for the cross-linked tissue samples. After 1 week of continuous heating, the cross-linked tissues showed a significant decrease in diameter in all cases except for *M*-tissue, which showed a less than 10% decrease in diameter. The shrinkage temperature,  $T_s$ , is considered to be the temperature at which the intramolecular bonds rupture, causing fusion of the ori-



**Fig. 3.** Photograph of the tissue samples, initially with a diameter of 1 cm, after heating at 80°C in water for 1 day or 1 week



**Table 2.** Changes in diameter and weight of sample tissues after treatment with heat and collagenase ( $n = 5$ )

Tissue type	Diameter change on heat treatment (%) <sup>a</sup>		Weight change in collagenase solution (%) <sup>b</sup>	
	24 h	1 week	24 h	1 week
D-tissue	>60	>90	n.a.	≈0
E-tissue	>10	>40	45	80
B-tissue	>5	>30	39	65
G-tissue	>5	>30	23	47
M-tissue	0	<10	20	41

n.a., not applicable

<sup>a</sup>Measured with digital vernier calipers

<sup>b</sup>See Eq. 1

ented peptide chains<sup>32</sup> and leading to denaturation of the triple helix. Cross-linking of the collagen molecules increases  $T_g$ , preventing tissue shrinkage on heating. During heating, the collagen molecules are cross-linked and the intermolecular cross-linkers are not affected, but the breakdown of the triple helix itself cannot be prevented.<sup>33</sup> This caused *E*-tissue to shrink the most among the cross-linked tissues because *E*-tissue is cross-linked only intrahelically. The shrinkage volume may change because the intermolecular cross-linkers functions as spacers. This is thought to be due to polymer–collagen intermolecular cross-linking resulting in an increase in the stability of the structure, which leads to an increase in the shrinkage temperature to greater than 80°C.<sup>18</sup>

The stability against collagenase activity was observed and is shown in Table 2. The collagenase solution started to degrade the tissue, and a significant amount of *D*-tissue degraded within 24 h. However, the cross-linked tissues showed slower degradation behavior compared to that of *D*-tissue. The in vitro degradation by collagenase provides important hints on in vivo degradation. Biodegradation of

the tissues is caused by collagenase cleavage of the collagen triple helix.<sup>26</sup> This is a common process in the living body, and it is caused by fibroblasts in the midst of a chronic inflammatory response. Table 2 shows that the degradation of the cross-linked tissues would most likely be slower than that of decellularized tissue in vivo. It is thought that the cross-linking of the triple helix holds the helices together, thereby suppressing degradation.<sup>18,26</sup> The slowest degradation was observed for *M*-tissue. This is because the MPC polymer that surrounds the collagen suppresses the action of the collagenase.<sup>18</sup> Detailed study using in vivo tests will be discussed in a later article.

#### Mechanical strength of cross-linked tissues

The effect on the mechanical strength of cross-linking the tissues was examined by using a strain test (Fig. 4). Sauren et al.,<sup>30</sup> Korossis,<sup>31</sup> and Schoen and Levy<sup>34</sup> divide the strain–stress curve into three separate phases: the elastin phase, which shows low stress; the collagen phase, which shows high stress; and the transition phase, which is intermediate between the elastin and collagen phases. During the elastin phase, the tissue offers little resistance to elongation since force transmission and load bearing are provided mainly by the elastin fibers. During this phase, the collagen layer in the fibrosa unfolds and collagen makes a minimal contribution to force transmission. In the transition phase, the collagen fibers align and uncoil gradually, increasingly contributing to force transmission. In the collagen phase, all the collagen fibers align and uncoil and the load is entirely borne by them. The slope of the stress–strain curve for this phase is steep and almost constant, reflecting the material properties of the collagen fibers.<sup>30,31</sup> Based on this fact, we analyzed the strain–stress curves by interpreting the elastin and collagen phases.

The mechanical strength results are shown in Fig. 4. Murakoshi et al. showed that the mechanical strength of

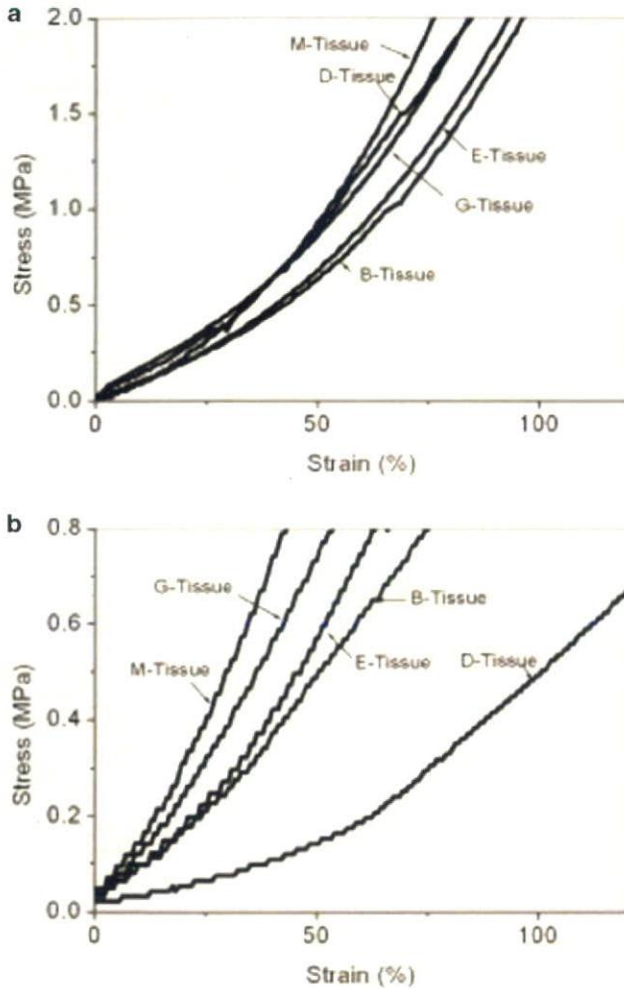


decellularized blood vessels did not differ from that of the original blood vessels.<sup>16</sup> This means that the change in the mechanical strength on cross-linking would be purely due to the cross-linking. Both circumferential (Fig. 4a) and longitudinal (Fig. 4b) straining showed a clear division of the elastin and collagen phases, implying that viscoelasticity could be maintained after cross-linking. The Young's

modulus of the circumferentially strained tissue was higher than that of the longitudinally strained tissue, probably because the elastin and collagen were oriented along the circumferential direction.<sup>16,35</sup> The difference between regular tissue and cross-linked tissue was clear when the tissues were strained longitudinally, where it was evident that the division between the elastin and collagen phases disappears. To characterize the mechanical strength of the tissues, we calculated the Young's moduli in the elastin and collagen phases, and show the results in Table 3 and 4.

Table 3 shows the numerical values of the Young's modulus when the tissue was strained circumferentially. In this direction, there was a significant difference between the elastin and collagen phases in intrahelically and interhelically cross-linked tissue and *D*-tissue. In the case of *M*-tissue, the Young's modulus in the collagen phase was almost double that of *D*-tissue. When the ratio of the Young's modulus in the collagen phase to that in the elastin phase was compared, an increase in the Young's modulus was observed for *M*-tissue, while there was no significant change observed for *E*-tissue, *B*-tissue, or *G*-tissue. It is thought that the polymer matrix provided extra strength to the tissue because PMA was randomly cross-linked with collagen intermolecularly. In the case of intrahelical and interhelical cross-links, the cross-linked points could not support the fiber mechanically. Furthermore, no significant change in the elastin phase was observed. This may imply that cross-linking between the elastin and the polymer did not occur, because the polymer could not penetrate the elastin layer located deep in the tissue. Thus, it can be said that the polymer cross-linked with the *D*-tissue functions as the main matrix of the tissue, but the cross-linkers can only function as a supportive matrix.

When the tissues were strained longitudinally, a significant increase in Young's modulus in the elastin and collagen phases was observed for all cross-linked tissues (Table 4). In this case, elastin and collagen fibers were stretched in the direction perpendicular to that for circumferential testing. The cross-linkers supported the engagement between fibers, increasing the mechanical strength and providing resistance against separation between fibers. However, the Young's modulus values were still less than those shown in Table 3 except for *M*-tissue in the elastin phase. This implies that the cross-linkers do not provide adequate support against segregation if the fibers are strained. In other words, the



**Fig. 4.** Stress-strain curves of the tissues strained circumferentially (a) and longitudinally (b) before and after cross-linking

**Table 3.** Mechanical strength of the tissues strained circumferentially ( $n = 5$ )

Tissue type	Elastin phase		Collagen phase		Young's modulus in collagen phase/ elastin phase
	Young's modulus (MPa)	Increment against <i>D</i> -tissue	Young's modulus (MPa)	Increment against <i>D</i> -tissue	
<i>D</i> -tissue	$1.15 \pm 0.13$	–	$3.27 \pm 0.40$	–	2.8
<i>E</i> -tissue	$1.10 \pm 0.42^*$	0.9	$3.81 \pm 0.83$	1.2	3.5
<i>B</i> -tissue	$0.94 \pm 0.31^*$	0.8	$3.56 \pm 0.53$	1.1	3.8
<i>G</i> -tissue	$1.27 \pm 0.33^{**}$	1.1	$4.28 \pm 0.52$	1.3	3.4
<i>M</i> -tissue	$1.10 \pm 0.29^*$	1.0	$6.11 \pm 0.73$	1.9	5.6

\* $P > 0.05$  versus *D*-tissue

\*\* $P < 0.05$  versus *D*-tissue



**Table 4.** Mechanical strength of the tissues strained longitudinally ( $n = 5$ )

Tissue type	Elastin phase		Collagen phase		Young's modulus in collagen phase/ elastin phase
	Young's modulus (MPa)	Increment against <i>D</i> -tissue	Young's modulus (MPa)	Increment against <i>D</i> -tissue	
<i>D</i> -tissue	0.21 ± 0.14	–	0.85 ± 0.10	–	4.0
<i>E</i> -tissue	0.53 ± 0.11**	2.5	1.60 ± 0.21	1.9	3.0
<i>B</i> -tissue	0.61 ± 0.11**	2.9	1.16 ± 0.17	1.4	1.9
<i>G</i> -tissue	1.21 ± 0.28**	5.8	1.90 ± 0.18	2.2	1.6
<i>M</i> -tissue	1.58 ± 0.24**	7.5	2.42 ± 0.24	2.9	1.5

\*\* $P < 0.05$  versus *D*-tissue

main matrix of the structure is made up of the collagen and the elastin fibers, while the cross-linked sites or polymer form a matrix supporting the molecules. This would lead to the stiffening of the tissue, and this can be clearly seen when the Young's modulus ratio of the collagen phase to the elastin phase is compared. It can be seen that the increase in the Young's modulus in the elastin phase is much greater than that in the collagen phase, leading to a decrease in the ratio between collagen phase and elastin phase as shown in Table 4. This is not because the cross-linkers are cross-linked with elastin, as mentioned in the paragraph above, but rather, because the cross-linkers actually function in a similar way to elastin, holding the collagen fibers together during straining. This caused the cross-linked tissues to be stiffer than decellularized tissues.

## Conclusions

Through this study, we attempted to investigate how a cross-linker affects the physical and mechanical properties of tissue. Cross-linking of a tissue should induce dimensional stability against heat and collagenase. Cross-linked polymer functions in the same way as elastin, while simple collagen cross-linking provides a supportive matrix that holds the collagen and elastin together. It is noteworthy that stability and mechanical properties are discussed in this study. Further, the conditions used in the study for investigating the mechanical strength may change according to the concentration of the cross-linker.

We believe that by cross-linking the tissue with MPC polymer, it is possible to provide the tissue with antithrombogenic and anticalcification properties; thrombosis and calcification have been problems in the clinical application of engineered tissues. The antithrombogenic and anticalcification properties of these tissues when used in vivo will be reported in a future study.

**Acknowledgments** This work was supported in part by Grants-in-aid for Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation from the Japan Health Sciences Foundation. This work was partly supported by Research on the Human Genome, Tissue Engineering, of Health and Labour Science Research Grant from Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. This work was also partly supported by a Grant-in-aid from the Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of the Japan Science and Technology Agency (JST). We would also like to thank Professor Kazuhiko Ishihara of The University of Tokyo for his kind assistance and advice on the preparation and analysis of the MPC polymer.

## References

- Viola J, Lal B, Grad O. The emergence of tissue engineering as a research field. NSF/Abt report. Available at <http://www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/emergence.htm>
- Liang H-C, Chang Y, Hsu C-K, Lee M-H, Sung H-W. Effects of crosslinking degree of an acellular biological tissue on its tissue regeneration pattern. *Biomaterials* 2004;25:3541–3552
- Talman EA, Boughner DR. Glutaraldehyde fixation alters the internal shear properties of porcine aortic heart valve tissue. *Ann Thorac Surg* 1995;60:S369–373
- Chachra D, Gratzner PF, Pereira CA, Lee MJ. Effect of applied uniaxial stress on rate and mechanical effects of cross-linking in tissue-derived biomaterials. *Biomaterials* 1996;17:1865–1875
- Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, van Luyn MJA, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:460–472
- Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bio-prostheses. *Biomaterials* 1997;18:95–105
- Sung HW, Chang WH, Ma CY, Lee MH. Crosslinking of biological tissue using genipin and/or carbodiimide. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:427–438
- Park S-N, Park J-C, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* 2002;23:1205–1212
- Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymond S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs* 2000;24:217–223
- Malone J, Brendel K, Duhamel RC, Reinert RL. Detergent-extracted small-diameter vascular prostheses. *J Vasc Surg* 1984;1:181–191
- Tamura N, Terai H, Iwakura A, Yamamoto Y, Matsumoto K, Ueda H, Inoue M, Nakamura T, Shimizu Y, Komeda M. An "acellular" vascular prosthesis may provide a scaffold for the host tissue regeneration. *Int J Artif Organs* 1999;22:419
- Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19:381–386
- Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Kearney JN, Watterson KG, Ingham E, Fisher J. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis* 2002;11:457–462
- Iwai S, Torikai K, Coppin CM, Sawa Y. Minimally immunogenic decellularized porcine valve provides in situ recellularization as a stentless bioprosthetic valve. *J Artif Organs* 2007;10:29–35
- Fujisato T, Minatoya K, Yamazaki S, Meng Y, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. Preparation and recellularization of tissue-engineered bio-scaffold for heart valve replacement. In: Mori H, Matsuda H (eds) *Cardiovascular regeneration therapies using tissue engineering approaches*. Tokyo: Springer, 2005: 83–94
- Murakoshi A, Kimura T, Funamoto S, Fujisato T, Nakatani T, Kitamura S, Kishida A. Effect of the pressurizing process on decellularized aortic tissue using ultrahigh hydrostatic pressurization. *Tissue Eng* 2007;13:1680 (Meeting Abstract: 136)



17. McFetridge PS, Daniel JW, Bodamyali T, Horrocks, Chaudhuri JB. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res* 2004;70A:224–234
18. Nam K, Kimura T, Kishida A. Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials* 2007;28:1–8
19. Nam K, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels. *Biomaterials* 2007;28:3153–3162
20. 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;8:32–37
21. Ishihara K, Nomura H, Mihara T, Kurita K, Iwasaki Y, Nakabayashi N. Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption? *J Biomed Mater Res* 1998;39:323–330
22. Ishihara K, Ishikawa E, Iwasaki Y, Nakabayashi N. Inhibition of fibroblast cell adhesion on substrate by coating with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1999;10:1047–1061
23. Iwasaki Y, Nakabayashi N, Ishihara K. In vitro and ex vivo blood compatibility study of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) copolymer-coated hemodialysis hollow fibers. *J Artif Organs* 2003;6:260–266
24. Takayuki K, Nojiri C, Kijima T, Horiuchi K, Mori T, Tanaka T, Asada T, Ishihara K, Akutsu T. Nonthrombogenic evaluation of ventricular assist devices coated with 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) copolymer. *Jpn J Artif Organs* 1999;28:196–199 (in Japanese)
25. Kihara S, Yamazaki K, Litwak KN, Litwak P, Kameneva MV, Ushiyama H, Tokuno T, Borzelleca DC, Umezumi M, Tomioka J, Tagusari O, Akimoto T, Koyanagi H, Kurosawa H, Kormos RL, Griffith BP. In vivo evaluation of a MPC polymer-coated continuous flow left ventricular assist system. *Artif Organs* 2003;27:188–192
26. Zecman R, Dijkstra PJ, van Wachem PB, van Luyn MJ, Hendriks M, Cahalan PT, Feijen J. Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. *Biomaterials* 1999;20:921–931
27. Ma Z, Kotaki M, Ramakrishna S. Surface modified nonwoven polysulphone (PSU) fiber mesh by electrospinning: a novel affinity membrane. *J Membr Sci* 2006;272:179–187
28. Bubnis WA, Ofner CM III. The determination of ε-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem* 1992;207:129–133
29. Everaerts F, Torrianni M, van Luyn M, van Wachem P, Feijen J, Hendriks M. Reduced calcification of bioprostheses, cross-linked via an improved carbodiimide-based method. *Biomaterials* 2005;25:5523–5530
30. Sauren AAHJ, van Hout MC, van Steenhoven AA, Veldpaus FE, Janssen JD. The mechanical properties of porcine aortic valve tissues. *J Biomech* 1983;16:327–337
31. Korossis SA. Biomechanics and hydrodynamics of decellularised aortic valves for tissue engineering. Ph.D. Thesis, The University of Leeds, Chap 4, 2002
32. Flory PJ, Garrett RR. Phase transitions in collagen and gelatin systems. *J Am Chem Soc* 1958;80:4836–4845
33. Xu F, Lu TJ, Seffen KA. Biothermomechanics of skin tissues. *J Mech Phys Solids* 2008;56:1852–1884
34. Schoen FJ, Levy RJ. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res* 1999;47:439–465
35. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Kearney JN, Watterson KG, Ingham E, Fisher J. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis* 2002;11:463–471