

た。得られた脱細胞化組織は、HE染色や圧縮試験機により評価した。

2.3 脱細胞化組織の移植実験

ブタ脱細胞化角膜のウサギ角膜への移植実験を行った。日本白色家兎の角膜を一部切開し、角膜実質層に約4mm辺のポケットを作製し、直径約2mm×厚み0.16mmの脱細胞化角膜を挿入した。比較対象としては、未処理のブタ角膜を用いた。移植後に経過観察を行い、移植後2ヵ月で移植片を取り出し、組織学的に観察を行った。

3. 結果

3.1. 界面活性剤と超高压処理技術による脱細胞化角膜の組織評価

界面活性剤処理した脱細胞化角膜を Fig.2 に示す。SDS 処理では、角膜の円周部の溶解と中央部での膨張がみられ、白濁化した。Triton X-100 においても、周辺部の溶解はなかったものの、著しく膨張・白濁化がみられた。処理角膜片をヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色にて組織学的な検討を行った。Triton X-100 では、角膜実質層、上皮層のいずれの層においても青色に染色された細胞核が確認され、ほとんどの細胞が除去されていないことが明らかとなった。角膜実質層のコラーゲン繊維について、正常な角膜実質層では Fig.2 のような高密度に配向したコラーゲン繊維として観察されるが、膨張する Triton X-100 では、繊維間の空隙の拡大がみられた。一方、SDS の場合、上皮層部のほとんどの細胞は除去されていたが、実質層では細胞の残存が示された。また、コラーゲン繊維の配向は大きく乱れ、コラーゲン繊維の切断および空隙の拡大が観察された。

超高压処理による脱細胞角膜では、10000 気圧の超高压印加により、生体角膜より白濁した脱細胞角膜が得られた (Fig.2)。また、H-E 染色所見では、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった。DNA 残存量の定量においても検出限界程度の DNA が定量されただけで、破壊された細胞の残渣はほとんど除去されていた。

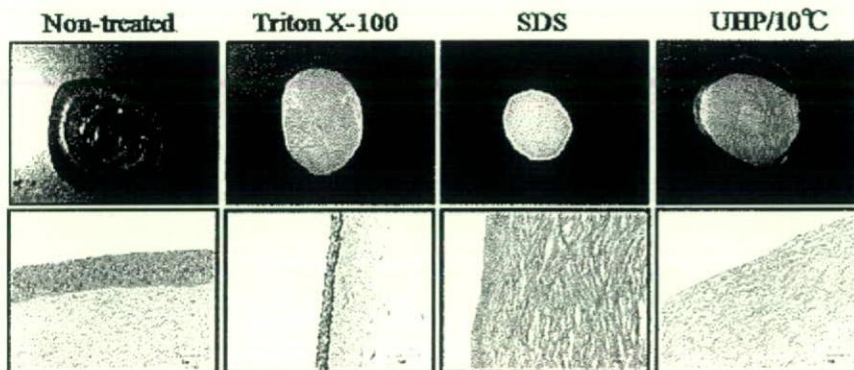


Fig.2. Photographs and H-E staining of the porcine corneas treated by UHP and detergent.

3.2. 超高压処理技術の脱細胞化角膜への影響

超高压処理で得られた脱細胞角膜は、生体角膜に比べ白濁していた。これは、生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により約70%の膨潤度に調節されていることが知られている。しかし脱細胞化することで、角膜内皮細胞のポンプ機能は傷害され、角膜は膨潤することで角膜の白濁は生じる。そこで、超高压脱細胞化により高度に膨潤した角膜が、脱水によ

る収縮により物性が回復するかどうかについて検討した。グリセロール溶液に浸漬することで浸透圧を調整し、その後の圧縮試験を行った。脱細胞化角膜の力学特性は、未処理角膜のそれとほぼ同等となり、移植後の角膜内皮細胞のポンプ機能により力学特性が回復される可能性が示された (Fig.3)。

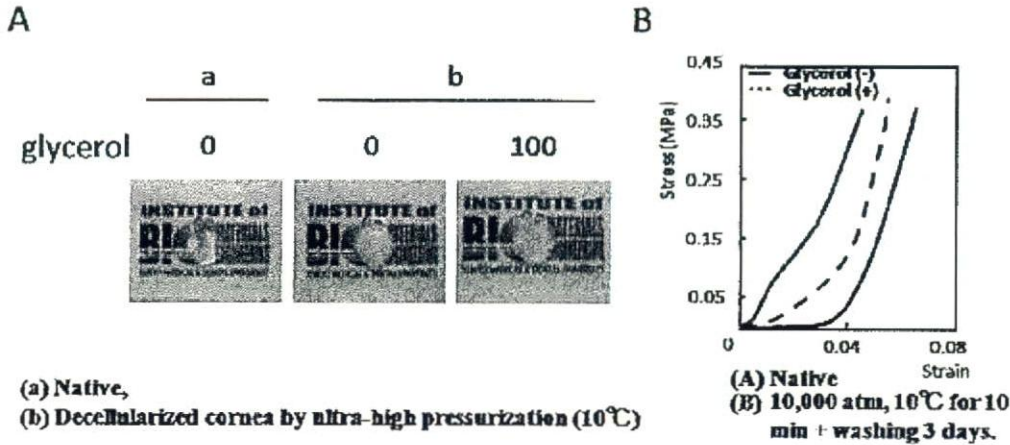


Fig. 3. A Photographs of decellularized corneas treated by glycerol immersion. B Stress-strain curve of the corneas treated under various conditions.

3.3. ウサギ角膜へのブタ脱細胞化角膜の移植実験

ウサギへの脱細胞化角膜移植実験の結果を Fig.4 に示す。移植直後および1週間後では、脱細胞化角膜は白濁しており、未処理角膜は透明であった。移植2週間後においては、脱細胞化角膜に変化は認められず白濁状態にあったが、一方の未処理角膜では炎症反応が示され若干の浮腫が認められた。移植4週間後には、脱細胞化角膜は透明になっていたが、移植部周辺にて若干の炎症が認められた。一方の未処理角膜では強い炎症による浮腫と血管の遊走が認められた。さらに、移植8週間後では、脱細胞化角膜の透明状態は維持されており、移植部周辺の炎症反応認められなかった。一方、未処理角膜では強い免疫応答が続いており、炎症に伴う血管の遊走が認められた。試料標本の H-E 染色では、未処理角膜においては多数の炎症細胞が観察され、埋入試料の確認ができなかった。一方の脱細胞化角膜においては、炎症細胞はほとんど観察されず脱細胞化角膜の残存が示された。

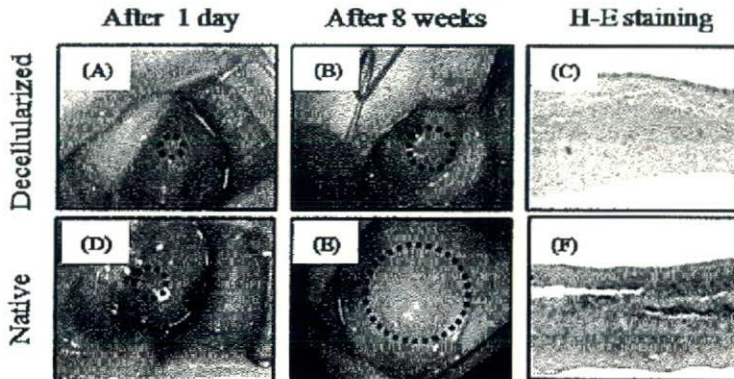


Fig. 4. Photographs and H-E staining of the porcine corneas implanted in rabbit after eight weeks (B, C, E, F).

4. 考察

国内外における脱細胞化組織研究の主流は、界面活性剤やタンパク質分解酵素等の薬液処理による脱細胞化法である。そこで、我々も種々の界面活性剤を用いて角膜の脱細胞化を試みた。イオン性界面活性剤である SDS は、細胞質、核膜の溶解が可能であり、強力な脱細胞化試薬として血管、弁、腱等の脱細胞化処理に用いられ、ほぼ完全な脱細胞化が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。しかし、タンパク質-タンパク質相互作用の破壊によるタンパク質変性の誘起およびグリコサミノグリカン (GAG) の溶解傾向も報告されている¹¹⁾。SDS による角膜脱細胞化では、ある程度脱細胞化されるものの完全な脱細胞化は達成されず、また、コラーゲン繊維間の空隙の拡大が示された。浸漬時間が短いため脱細胞化が不十分であったと考えられるが、コラーゲン繊維配向の乱れが示されていることから、更なる浸漬時間の延長は困難であると考えられる。コラーゲン繊維配向の乱れは、SDS による GAG 溶解によって誘起されていると考えられ、血管、弁等の組織に比べ高い GAG 含有率の角膜組織の脱細胞化においては SDS の利用は不適であると考えられる。一方、タンパク質 (生体組織) 変性を誘起しない非イオン性界面活性剤である Triton X-100 では、コラーゲン繊維へのダメージは少ないものの、繊維間距離の拡大し、脱細胞化もほとんどなされなかった。Triton X-100 による脱細胞化処理では、用いる組織により脱細胞化効率が異なることが報告されており、何らかの角膜特性が脱細胞化に影響したと考えられる。これらの結果より、角膜の脱細胞化においては、界面活性剤のみでの利用は不適であると言える。

これに対して、我々が開発した超高压処理法は、超高压印加により細胞を破壊した後、細胞培地を用いた洗浄により細胞残渣を除去する方法であるが、10000 気圧の超高压印加により、白濁した角膜が得られた。また、H-E 染色所見では、細胞核の完全な除去が示され、コラーゲン繊維配向の大きな乱れは観察されなかった。これらの結果は、超高压処理法による脱細胞化の有用性を示している。しかしながら、上記の界面活性剤法に比べて低いものの、処理による角膜の白濁と膨潤がみられた。この膨潤により角膜透過性が減少しているものと考えられ、角膜機能の一つである透過性を獲得するためには解決すべき問題である。そこで、デキストランを添加することで角膜の膨潤抑制を試みた。その結果、超高压処理、洗浄操作後の膜厚抑制がデキストラン添加により示された。また、生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により、角膜の透明性が維持されていることが知られている。従って、超高压脱細胞化により高度に膨潤した角膜が、脱水により収縮し、透明性が回復することができれば、移植人工角膜としての応用可能性が示唆される。そこで、脱水モデル実験として、超高压処理により得られた脱細胞化角膜を高張液であるグリセロールに浸漬し、透明性の回復について検討した。50%、100%グリセロール溶液に1時間浸漬すると、50%グリセロールにて半透明に透明性が回復し、100%グリセロールでほぼ透明になった。これらの結果は、得られた超高压脱細胞化角膜の移植時における透明性回復の可能性を示している。さらに、ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植試験では、炎症反応はほとんど認められず、透明性が獲得された。以上のこれらの結果から、超高压処理技術を用いた脱細胞角膜は生体由来人工角膜としての応用が期待できる。

謝辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金およびヒューマンサイエンス総合研究事業にて行なわれた。

参考文献

- [1]Chirila TV. (2001) An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials*. 22(24): 3311- 3317.
- [2]Duan D, Klenkler BJ, Sheardown H. (2006) Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue-engineered corneas. *Exp Rev Med Devices*. 3(1): 59-72.
- [3]Kobayashi H, Kato M, Taguchi T, Ikomo T, Miyashita H, Shimmura S, Tsubota K Tanaka J. (2004) Collagen immobilized PVA hydrogel-hydroxyapatite composites prepared by kneading methods as a material for peripheral cuff of artificial cornea. *Mater Sci & Eng C*. 24(6-8): 729-735.
- [4]Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, Taguchi T, Asano-Kato N, Uchino Y, Kato M, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. (2006) Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res Pt B*. 76B(1): 56-63.
- [5]Chirila TV, Charila M, Ikada Y et al. (2005) A historical review of artificial cornea research in Japan. *Jpn, J Ophthalmol* 49: S1-S13.
- [6]Fujisato, T, Minatoya, K, Yamazaki, S, Meng, Y, Niwaya, K, Kishida, A, Nakatani, T, Kitamura, S. Preparation and Recellularization of Tissue Engineered Bioscaffold for Heart Valve Replacement, In, Mori, H, Matsuda, H, (ed), *Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches*. Springer. pp83-94.
- [7]Fujisato T, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S. (2006) Host cell infiltration to transplanted acellular allografts in porcine model. *Tissue Eng*. 12(4): 1077-1077
- [8]Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. (2006) Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 27(19): 3675-3683.
- [9]Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. (2005) Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Val Disease*. 14(2), 228-237.
- [10]Meyer SR, Nagendran J, Desai LS, Rayat GR, Churchill TA, Anderson CC, Rajotte RV, Lakey JRT, Ross DB. (2005) Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. *J Thoracic Cardio Surg*. 130(2): 469-476.
- [11]Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. (2005) Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardio-Thor Sug*. 27(4): 566-571.

Evaluation of Artificial Cornea Made by Ultra-High Hydrostatic Pressure Technology

Seiichi Funamoto^{*1,2}, Yoshihide Hashimoto^{1,2}, Syuji Sasaki^{2,3},
Shinya Hattori², Takako Honda², Kwangwoo Nam¹,
Mamabu Mochizuki³, Toshiya Fujisato⁴, Tsuyoshi Kimura^{1,2},
Hisatoshi Kobayashi^{1,2}, Akio Kishida¹

¹*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda-Surugadai2-3-10, Chiyodaku, Tokyo, 101-0062, Japan*

²*Biomaterials Center, National Institute for Material Science, Sengen 1-2-1, Tsukuba, Ibaraki, 305-0047, Japan*

³*Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Yushima 1-5-45, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519, Japan*

⁴*Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Omiya 5-16-1, Asahiku, Osaka, 535-0002, Japan*

**E-mail: funamoto.fm@tmd.ac.jp*

Proceedings of the 15th Symposium for Japanese Research Group of High Pressure Bioscience and Biotechnology

Received 24 January 2008/Accepted 31 January 2008

Abstract

We investigated the characteristics of a decellularized porcine cornea by ultra-high hydrostatic pressurization (UHP) method. The UHP method consists of the disruption of cells by hydrostatic pressurization and the removal of components of the disrupted cells by washing process. Porcine cornea were hydrostatically pressed at 10,000 atmospheres and 10 °C for 10 min and immersed in medium for 72 hours. The turbid cornea was obtained. For H-E staining of the cornea decellularized with the UHP method, the complete removal of corneal cells and maintenance of the superstructure of collagen fibrils were confirmed. When the corneas were immersed in glycerol for 1 hour, their optical and mechanical properties were restored to those of a natural cornea. As the preliminary animal study, when the implantation of the acellular porcine cornea to rabbit cornea was carried out, the immune reaction was not occurred and the turbid cornea became clear. These results indicate that the decellularized cornea by UHP method would be useful as corneal scaffold for regeneration. These results indicate the possibility of the acellular cornea prepared by the UHP method as artificial bio-cornea.

Keywords : Artificial cornea, Decellularization, Ultra-high hydrostatic pressure technology.

バイオスキャフォールド



寺田堂彦^{*1)} (写真左), 木村 剛・岸田晶夫^{*2)}, 藤里俊哉^{*1)} (右)

JJSB

Biological scaffold

A biological scaffold is an extracellular matrix body derived from biological tissues and is made through removal of unnecessary components from the tissues. An extracellular matrix is a polymer superstructure produced by cells and is an appropriate environment for cells in a biological tissue. Although there are some problems to utilize the scaffold as a biomaterial, there are certain advantages rather than disadvantages in biological scaffolds. In this article, advantages and disadvantages of a biological scaffold are described and an outline of researches related to biological scaffolds in the world is given. And then our researches are introduced.

生体組織から不要成分を除去して作製した細胞外マトリクス(ECM)構造体を、バイオスキャフォールドという。ECMは、細胞がみずからつくり出した高分子超構造であり、生体内で最適環境として機能していたスキャフォールドである。そのスキャフォールドを取り出して人工的に利用するためには解決すべき課題もあるが、それを上回る多くの利点もある。

本稿では、まずバイオスキャフォールドの紹介を兼ねて、バイオスキャフォールドの利点と問題点について解説し、世界の主な研究を鳥瞰したのち、最後に筆者らの研究について紹介する。

Dohiko Terada^{*1)}, Tsuyoshi Kimura・Akio Kishida^{*2)}, Toshiya Fujisato^{*1)}

Key words: バイオスキャフォールド, 細胞外マトリクス, 脱細胞, 心臓弁, 角膜

ハーバード大学の Vacanti JP と MIT の Langer R らのグループによって再生医療の発端となる研究論文が発表されてから20年が経過した。昨今、誘導多能性幹細胞(iPS細胞)の開発²⁾や、細胞シート移植による治療など、再生医療に関する話題が一般のニュースとして伝えられる機会が増え、臨床応用への期待はこれまでになく高まっている。

組織工学による再生医療の3要素としては、細胞、増殖因子、足場の三つがあげられる。なかでも再生医療の主役は細胞であり、足場はそのサポート

役でしかない。しかしながら、古くはその役割が間隙を満たすのみと考えられてきた細胞外マトリクス(ECM)の、“場”としての重要性が認識されるようになった。細胞生物学などの発展に伴って、細胞の増殖・分化、機能を制御するシグナル因子としてのマトリクスの役割が徐々に解明されてきている³⁾。

足場を構築する材料としては、合成高分子、セラミックス、金属などがあげられるが、本稿のテーマは“バイオスキャフォールド”である。ECMは、細胞がみずからつくり出した高分子超構造であり、生体内で最適環境として機能していたスキャフォールドである。そのスキャフォールドを取り出して人工的に利用するためには解決すべき課題もあるが、それを上回る多くの利点もある。

バイオスキャフォールドはバイオマテリアルとしてはいまだマイナーな存在である。そのため本稿では、まずマテリアルとしての紹介を兼ねた一般論を概説し、世界の主な研究を鳥瞰した後、最後に筆者らの研究について紹介する。

^{*1)} Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology 大阪工業大学工学部生体医工学科

^{*2)} Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University 東京医科歯科大学生体材料工学研究所
[略歴](寺田堂彦) 2005年 京都工芸繊維大学大学院工学部科学研究所先端ファイブ科学専攻博士後期課程修了。博士(工学)取得。2005年 国立循環器病センター研究所再生医療部リサーチレジデント。2007年 大阪工業大学工学部生体医工学科流動研究員。専門:高分子工学,組織工学。趣味:自由
[略歴](藤里俊哉) 1991年 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻博士後期課程認定退学。同年 京都大学生体医療工学研究センター(現再生医科学研究所)研修員。1994年 国立循環器病センター研究所実験治療開発部研究員。1998年 マギル大学付属モントリオール総合病院研究所研究員。2000年 国立循環器病センター研究所実験治療開発部研究員。2003年 国立循環器病センター研究所再生医療部機能再生研究室長。2007年 大阪工業大学工学部生体医工学科教授。専門:バイオマテリアル,再生医学。趣味:DIY,旅行計画

表1 スキャフォールドが満たすべき条件

- ① 生体安全性
- ② 生体(細胞)親和性
- ③ 組織再生のための空間の確保
- ④ 適度な分布で細胞を保持できること
- ⑤ 組織再生に伴って分解吸収されること
- ⑥ 対象組織の形状テンプレートとなること
- ⑦ 再生に至るまで、組織が担うべき物理的強度を担うこと



図1 ブタ組織のIV型コラーゲン免疫染色写真

バイオスキャフォールドとは

本稿の執筆を機に、国内外の再生医療、組織工学に関する書籍を改めて調査したが、バイオスキャフォールドに関する詳しい記述は皆無に等しかった。したがって、バイオスキャフォールドの定義をここで明示することは難しい。しかし、アメリカ国立医学図書館が無料公開しているインターネットサイト PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>) での検索結果よりコンセンサスを推察すると、以下のようであろう。

バイオスキャフォールドとは、“生体組織から不要成分(ドナー細胞など)を除去するなどして作製したECM構造体”である。英語では一般に“biological scaffold”と表記され、化学架橋などを施されて生分解性を失った移植用組織は“bioprosthesis”などと記される場合が多いように見受けられる。

久保木らの定義によると、人工ECMとは、細胞の環境として機能する人工生産物である⁴⁾。ただし、広義なバイオマテリアルよりも以下の特徴などで限定的である。すなわち、天然のマトリクスの要件が

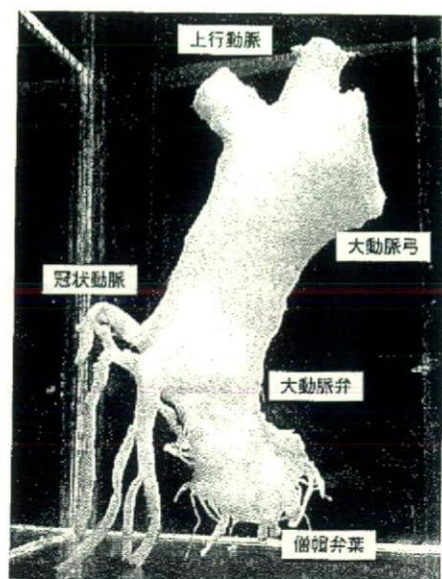


図2 大動脈弁周辺組織から作製したバイオスキャフォールド

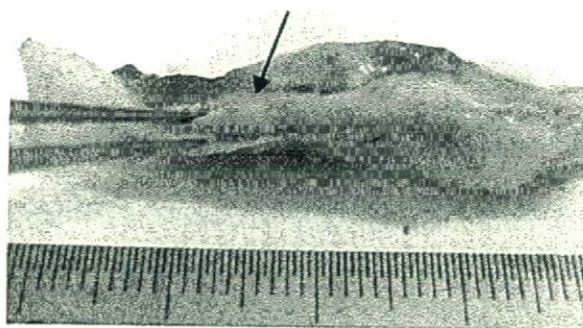


図3 石灰化によって硬化したミニブタの血管中膜
矢印は板状に固まったリン酸カルシウム

考慮されており、ECM幾何学の要件を満たして“最適空間”を細胞に与え、さらには、“天然のマトリクスの知識”に基づいて調製された材料あるいはシステムであることである。これらの項目がバイオマテリアルのなかにおける人工ECMを特徴付けるとすると、バイオスキャフォールドは人工ECMの範疇にあるが、そのなかでもさらに特異な領域に分類されるであろう。

バイオスキャフォールドの利点

In vivo あるいは *in vitro* のいずれの場合においても、組織を再生するためには、細胞が付着して増

殖・分化するための足場が必要である。特に心臓弁組織や大動脈組織など、ECMがその力学的特性を大きく担う組織を、細胞のみで再構築することは難しい。

組織再生のための足場材料に必要とされる条件は、表1のように考えられる。わが国におけるスキヤフォールド研究では吸収性高分子が優勢であり、各対象組織に対してすぐれた成果が報告されている。吸収性スキヤフォールドは必要条件をある程度満たすうえ、製品安定性、設計性、量産性など工業製品としてのメリットも多い。バイオスキヤフォールドは、動物由来という面で製品化のための課題は多いが、吸収性スキヤフォールドにはないユニークなメリットを有しているのも確かである。

現在、移植用臓器開発のために、ドナー動物としてのブタの研究が多数行われている。日本では、鹿児島大学の中西らが改良開発したクラウン系ミニブタが医用ミニブタとして広く利用されはじめており、ジャパンファーム社のジャパンファームクラウン研究所ではドナーソースとしての基礎研究が進められている⁹⁾。ブタが選ばれる理由として解剖学的な類似性、生理学的特徴、倫理面、供給量などがあげられる。ヒト組織との解剖学的類似性は、バイオスキヤフォールドをブタ組織から作製する際の大きなメリットの一つである。

生体組織を構成しているECMには、コラーゲン型の傾斜構造が存在する⁶⁾。内皮細胞や平滑筋細胞は、基材のコラーゲン型の違いによって形態や増殖挙動が異なることが知られている^{7,8)}。つまり、細胞に合目的な挙動を期待するためには、スキヤフォールドにも μm オーダーの傾斜構造を持たせる必要があるといえる。コラーゲン型の傾斜、階層構造の例として、ブタ組織をIV型コラーゲン免疫染色した組織観察像を図1に示した。図のように、I型コラーゲンマトリクス中にIV型コラーゲンで囲まれた小口径血管を確認することが出来る。

さらに、基材の幾何学的要素や、物理的性質の異方性なども細胞挙動に対して影響を及ぼすため、スキヤフォールドは非常に厳しい要求を満たさなければならない。しかしながら、再生対象組織を構築していたECM構造体を取り出して、それを組織再生

のスキヤフォールドとして利用する場合には、スキヤフォールドが満たすべき要件は少なからず満たされていると考えられる。

バイオスキヤフォールドのこれらの特性を適切に有効利用できれば、組織再生を促進する適切な足場を提供することが出来る。図2は、筆者らが作製した大動脈弁周辺組織の再生用バイオスキヤフォールドである。僧帽弁葉、大動脈弁、左右の冠状動脈、2本の上行動脈が一体で作製されており、心臓周辺の複雑な解剖学的特徴と、血管組織としての力学的特徴、血管組織に必要なECMの傾斜構造などを兼ね備えている。

バイオスキヤフォールドの問題点

バイオスキヤフォールドの潜在的な問題点として石灰化(calcificationあるいはmineralization)があげられる。石灰化とは、アパタイト様のリン酸カルシウムが過度に沈着することを意味し、慢性的な炎症の原因となるほか、硬化した組織は破断に至ることもある。顕著な石灰化によって血管中膜がアパタイトの板状になってしまった例を図3に示した。石灰化は、われわれの体内でも日常的に起こる正常な生理的現象であり、骨形成などがその例である。そのため、動物実験において、老年個体よりも、骨形成期にある若年個体に顕著な石灰化がみられることが知られている^{9,10)}。非常に軽微なものであれば代謝によって消滅するが、図3のような場合、自然に健常組織を回復することは期待できない。

石灰化はさまざまな原因と機序で生じる。不完全な脱細胞化処理による細胞残渣、コラーゲン線維、あるいはエラスチン変性物へのカルシウムの沈着が起点となるという説が一般的である^{11,12)}。脱細胞化ブタ組織をラット皮下に移植し、12週後に取り出してKossa染色により石灰化の様子を観察した(図4)。リン酸カルシウムがエラスチン線維に沿って沈着している様子と、顆粒状に分散している様子が見られる。いずれも同じ処理群の試料をラット皮下へ移植して生じた石灰化であるが、リン酸カルシウムの沈着には異なる機序が働いたと推察せざるをえない。In vivoでの迅速な再細胞化は石灰化を抑制すると

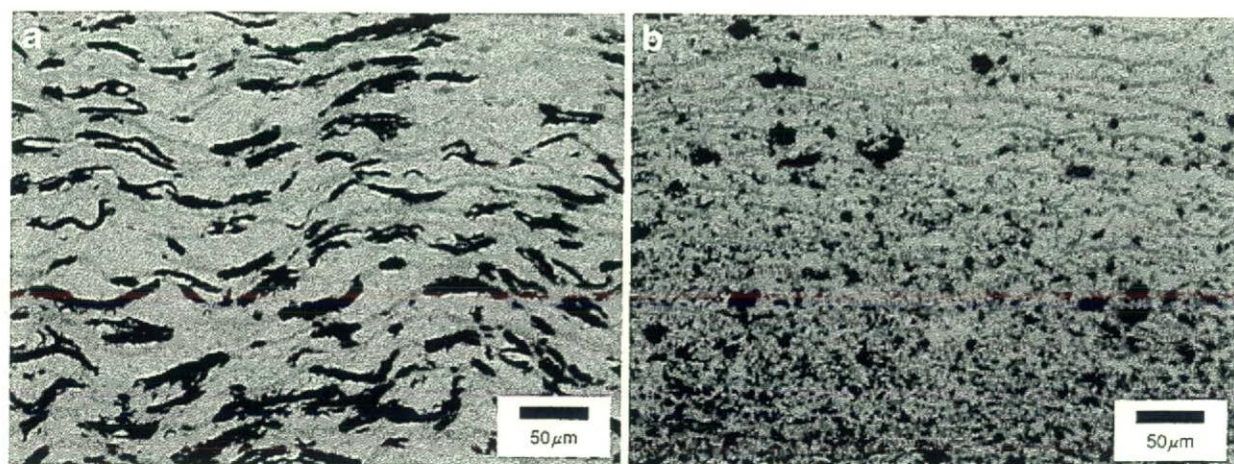


図4 ラット皮下へ移植した脱細胞化ブタ組織のKossa染色写真
 a: エラスチン線維に沿って生じた石灰化
 b: 顆粒状に分散して生じた石灰化

考えられるが、一方で、浸潤した線維芽細胞がエラスチン分解物によって骨芽細胞様の挙動を呈し、能動的に石灰化を促進するという研究もある¹³⁾。石灰化を抑制する方法についても種々検討されているが¹⁴⁻¹⁶⁾、いまだに根本的な解決策は見つかっていない。

ドナー動物由来のウイルスについても考慮が必要である。これは動物臓器をヒトへ移植する際に危惧される問題であり、世界各国で盛んに研究されている。ドナー動物では病気を引き起こさない内在性レトロウイルスが、ヒトの体内で変質・感染して新たな病気の原因となる可能性が懸念されている。ブタ内在性レトロウイルス (porcine endogenous retrovirus: PERV) のヒトへの感染は以前から危惧されてきたが、ブタ生体弁移植を受けた患者の追跡調査では、現在のところヒトへの感染は報告されていない¹⁷⁾。しかし、将来的に絶対的な安全性が保障されているわけではないため、現在でもさまざまな研究が行われている¹⁸⁻²⁰⁾。これは動物臓器の移植に限った問題ではない。異種動物由来のバイオスキャフォールドにも、ウイルスの完全な除去が求められる。

異種動物組織のヒトへの移植では、まず拒絶反応の問題を解決しなければならない。ヒトに生まれつき備わる自然抗体 anti-Gal が、異種動物細胞の表面に発現している糖鎖抗体 α -Gal と反応して超急性拒絶反応を引き起こす。この超急性拒絶反応を回避す

るための研究は、数多く行われている²¹⁻²³⁾。Galili, Tanemura らによると、 α -Gal は非常に強力な抗原であり、大量の高親和性 anti-Gal 産生を誘発するため、たとえトランスジェニックで α -Gal の発現を 95% 抑制しえたとしても、異種移植片の拒絶反応を抑制するには不十分である²⁴⁾。すなわち、バイオスキャフォールドにおいても、ドナー細胞の 5% の残存が致命的な超急性拒絶を招く可能性を考えなければならない。臨床で使用されている初期のブタ生体弁には α -Gal の残存が報告されており、それが石灰化を誘発する一因であるとする報告もある²⁵⁾。

バイオスキャフォールド研究の現状

バイオスキャフォールドに関する世界の代表的な研究を紹介する。

世界で最も臨床に近い研究を行っているのは、Konertz (ベルリン医科大学, ドイツ) らのグループである。脱細胞化したブタあるいはヒト肺動脈弁に、自己内皮細胞を播種培養し、ロス手術に伴う右室流出路再建に用いている。2000 ~ 2003 年の間に移植手術を受けた 23 例の 5 年間の中期成績では、再手術 1 例、死亡 1 例を除く 21 例について、経胸腔エコー、MRI、マルチスライス CT などにより、正常な弁機能を報告している²⁶⁾。また、同弁移植後 6 年の患者から血管壁の一部を採取し、内腔面が内皮細

胞層に覆われていることと、血管壁深部までの細胞化を確認している²⁷⁾。彼らのグループでは、脱細胞化ブタ肺動脈弁のヒトへの異種移植で、石灰化することなく再細胞化し、レシピエントの成長に伴って血管径も増すことを証明している^{28,29)}。また、内皮細胞播種の必要性についても検討を行っており、移植に先立つ *in vitro* での内皮化は必要ないとの結論を示している³⁰⁾。現時点でヒトへの適用は右室流出路再建に限られているが、同種、異種ともに移植組織の成長を窺わせる素晴らしい研究である。

Haverich A (ハノーバー大学, ドイツ)らのグループも、脱細胞化心臓弁のヒトへの移植を行っている。肺動脈弁に先天性の疾患を持つ小児患者2例(13歳と11歳)に対して、自己末梢血より単離した単核球細胞を播種した脱細胞化ヒト肺動脈弁を移植し、移植3年後の成績を報告している³¹⁾。小児患者の成長に追従した移植組織の成長が確認されていることは、非常に興味深い。この臨床試験に先立ち、基礎研究や前臨床試験についての結果も多数報告されており³²⁻³⁵⁾、今後の研究成果も大いに期待される。

心臓弁再生を目的としたバイオスキャフォールドでは、Fisher J と Ingham E (リーズ大学, イギリス)らのグループも前臨床試験で良好な成績を報告しており³⁶⁻³⁸⁾、Simon P (ヴィエナ医大, オーストリア)らのグループの研究成果も多数報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。心臓弁は形状が複雑なうえ、絶えず動的な血流負荷に抗しなければならぬため、組織再生にはスキャフォールドが必要不可欠である。心臓弁再生にバイオスキャフォールドを利用する研究はほかにも多数見受けられる^{26,42)}。

Badyack SF (ピッツバーグ大学, アメリカ)らのグループは、脱細胞化したブタ由来小腸粘膜下組織や膀胱組織に関して精力的に研究を行っている⁴³⁻⁴⁵⁾。先述のHaverichらの研究はレシピエント細胞を播種したテーラーメイド型であるのに対して、Badyackらの研究は汎用的な利用を目的として、異所組織への応用、保存、滅菌方法に関する検討^{46,47)}などが多い。今年2月にフェニックス(アメリカ)で開催された“Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine, 5th Symposium”では、全48件の研究発表中、8件が彼らのグループによるものであった。また、同氏はバ

イオスキャフォールドに関する執筆も多い⁴⁸⁻⁵⁰⁾。

わが国のバイオスキャフォールドに関する研究では、澤(大阪大学)らのグループがすぐれた成果を多数報告している^{51,52)}。生体吸収性ポリマーを用いた再生型人工血管は、ポリマーの分解吸収に伴う強度低下により左心系への適用が懸念されてきたが、同グループはバイオスキャフォールドを左心系へ移植しており、移植後6カ月での良好な成績を報告している⁵³⁾。ブタ組織から作製したバイオスキャフォールドをイヌに対して移植しており、異種移植で成果を上げている点でも興味深い。

また、梅津(早稲田大学)らのグループもバイオスキャフォールドを用いた心臓弁再生に取り組んでいる⁵⁴⁾。

バイオスキャフォールドの作製方法

臨床で用いられているブタ由来の生体弁は脱細胞化されておらず、通常、ブタ細胞の抗原性を抑制するためにグルタルアルデヒド(GA)で固定化処理が施されている。しかしながら、GA処理によって抗原性を抑えられる一方で、生体弁が体内で分解吸収されることもないため、自己弁の再生を期待することは不可能である。

バイオスキャフォールドは、それ自体の分解吸収性を損なうことなく、ドナー細胞の抗原性を除去しなければならない。そのため、界面活性剤を用いて組織内部からドナー細胞を洗い流すのが一般的である。SDS(sodium dodecylsulfate)、Triton X-100あるいはSD(sodium deoxycholate)といった界面活性剤を用いた脱細胞化処理が主流であり、トリプシンやDNase、RNaseなどの酵素と併用する場合もある。各種の脱細胞化法の効果を比較検討する研究も多い⁵⁵⁾。

Haverichらによると、酵素法は基底膜に損傷を与え、組織の引張り特性を低下させるが、界面活性剤はそれらをよく保存する⁵⁶⁾。また、Taylor DAらは、ラット心臓の冠状動脈にSDSを灌流することにより、PEG(polyethylene glycol)、Triton X-100あるいは酵素法よりもすぐれた脱細胞化効果を得られることを示している⁵⁷⁾。一方、Simon Pらは、SDSはマト

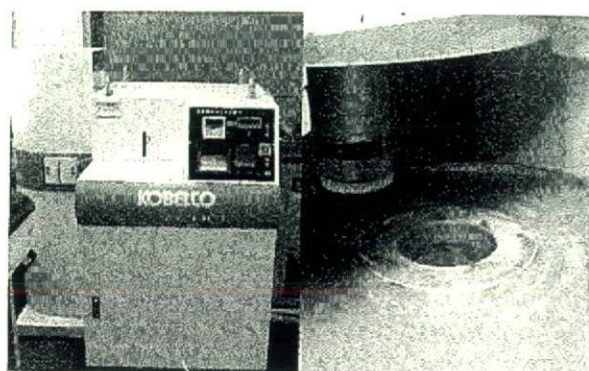


図5 冷間等方圧印加装置(神戸製鋼所製 Dr.CHEF)

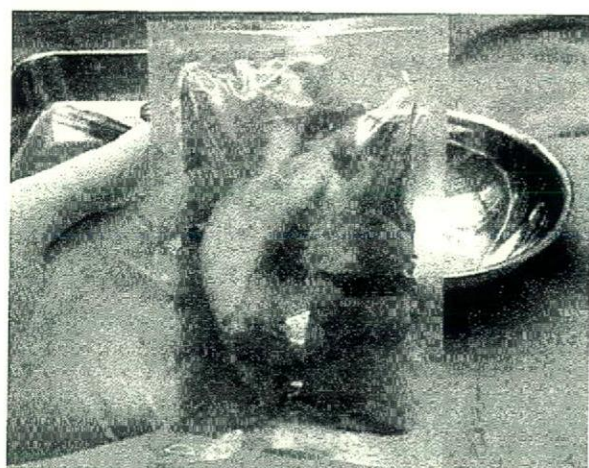


図6 凍結保存ヒト心臓弁組織

リクス構造を変性させるという理由から, Triton X-100 と SD がよいと結論付けている⁵⁸⁾.

界面活性剤は対象組織によって脱細胞化効果が異なることが知られている。また, 研究者によって処理条件や評価方法は異なる。脱細胞化度の評価は, 一般的に組織染色と DNA 定量によってなされるが, 今後, 臨床での安全性を確保するための統一した評価項目, 評価方法, 評価基準の確立が必要であり, ISO への提案も検討されている。

筆者らの研究

筆者らのグループでは, 界面活性剤を用いない脱細胞化法として, 超静水圧印加法を提案してきた(図5)。対象組織に静水圧(980 MPa=約10,000 atm)を印加してドナー細胞を破壊したのち, 界面活性剤を含まない洗浄液で細胞残渣を洗い流す方法である。

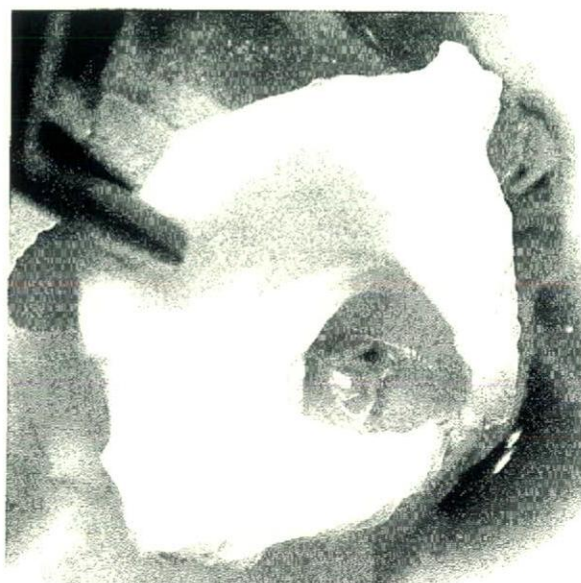


図7 移植6カ月後の肺動脈弁バイオスキャフォールド

超高压を印加することでレトロウイルスを不賦化でき, ドナー組織に感染している細菌類を死滅できる効果もあり, バイオスキャフォールドの安全性を高める技術として研究を行ってきた。超高压印加処理を施したブタ組織からは, 細菌と PERV が検出されなくなることを確認している。

本人あるいは家族の同意により死体から提供されるホモグラフト(移植用ヒト組織)には, 摘出時の細菌検査で感染が認められ, ヒトへの移植に供されずに凍結保存処置される組織が少なからずある。そのような感染ヒト組織(国立循環器病センター組織保存バンクより提供)に対しても, 超静水圧印加法による滅菌効果と脱細胞化効果が得られることを確認している(図6)。貴重な提供組織を有効に利用できる技術として研究を進めている。

1. 心臓弁バイオスキャフォールド

超高压印加法によってミニブタ肺動脈弁組織から作製したバイオスキャフォールドを, 同種ミニブタの肺動脈位へ置換移植して6カ月後の様子を図7に示す。肉眼所見で異常は認められず, ネイティブ組織と同様の平滑な内腔面を有している様子がわかる。また, 組織染色像において, バイオスキャフォールド内に無数のレシピエント細胞が浸潤している様子と, 内腔表面が内皮細胞に覆われている様子を確認

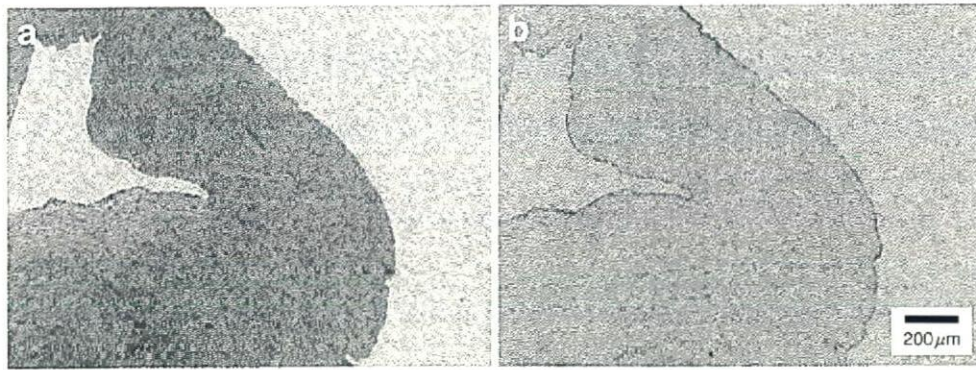


図8 肺動脈弁バイオスキャフォールドの移植6カ月後の組織染色写真
a: HE染色, b: vWF染色

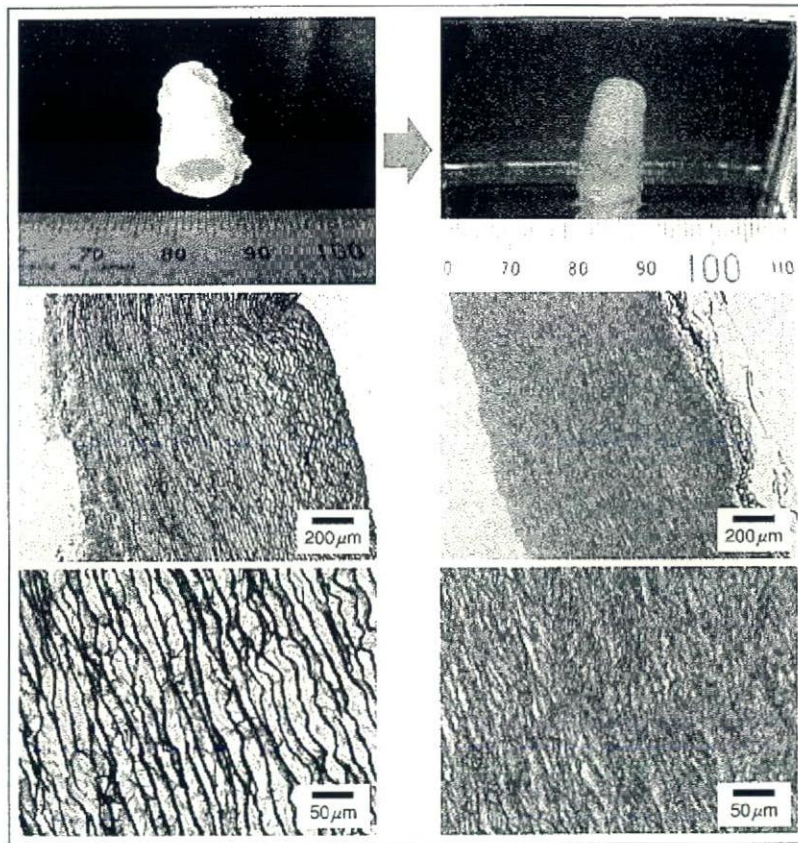


図9
ミニブタ動脈組織から作製した
バイオスキャフォールド
酵素法によって動脈組織から弾性線
維を分解除去し、コラーゲン線維の
みからなるバイオスキャフォールド
を作製した。EVG染色によって弾性
線維の消失を確認することが出来る。

することが出来る(図8)。さらに、移植後12カ月の時点において、エコー検査によって正常な弁機能を確認している。

筆者らの心臓弁バイオスキャフォールドは、肺動脈弁置換で非常に良好な成績を得ることが出来るが、大動脈弁位では石灰化を呈するレシビエント固体がある。臨床でバイオスキャフォールド心臓弁の移植を行っている Konertz や Haverich らのグループにお

いても、肺動脈弁置換に限られており、大動脈弁置換に関する研究は報告されていない。大動脈弁置換では、おそらく筆者らと同様の問題に直面しているのではないだろうか。右心系と左心系とでは、血流の成分や血圧など、バイオスキャフォールドの晒される環境にいくつかの違いがある。現在、国立循環器病センターと共同で改善方法を検討中である。

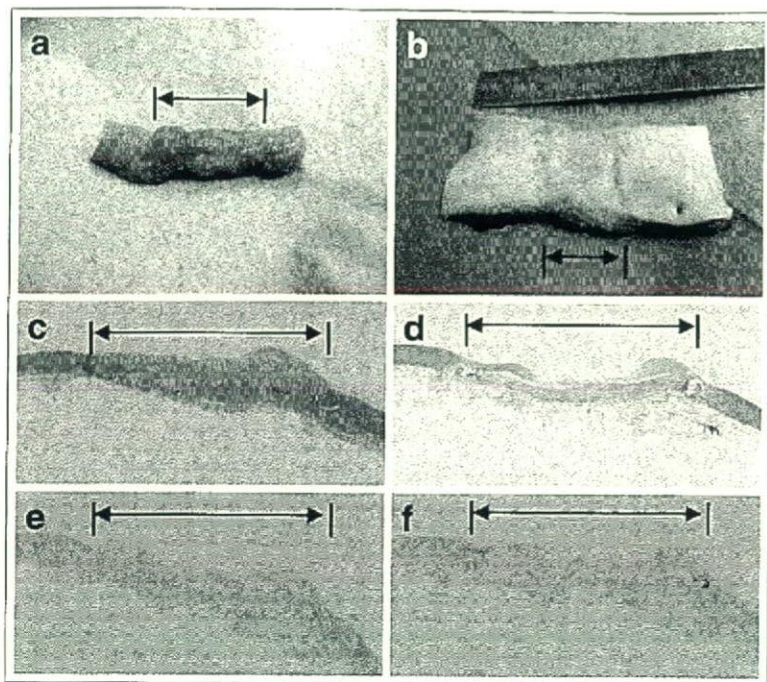


図10
移植3カ月後に取り出したバイオ
スキャフォールドの外観と組織染色写真
a: 外植組織の外観
b: 血管内腔面
c: HE染色
d: α -SMA染色
e: CD3染色
f: Kossa染色

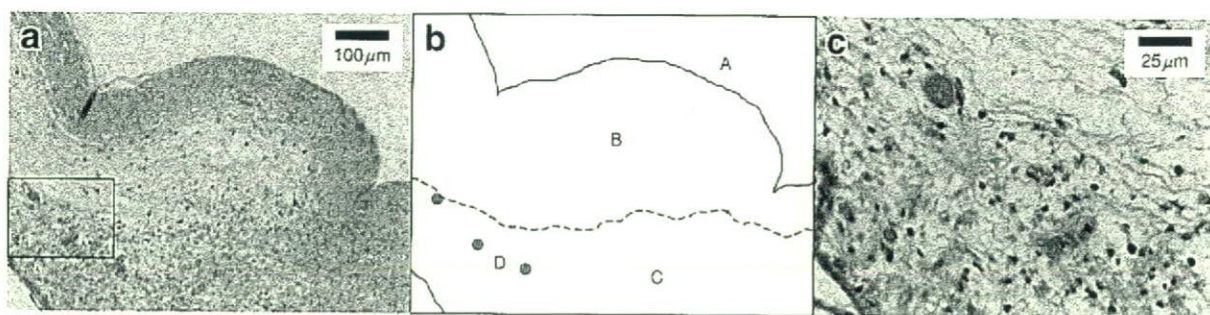


図11 動脈バイオスキャフォールドの移植1カ月後のHE染色写真
a: 血管軸方向断面
b: a解説図。A: 血管内腔面, B: 細胞が達していない領域, C: 再細胞化した領域, D: 微小血管
c: a中腔内の強拡大写真

2. 角膜バイオスキャフォールド

角膜実質はコラーゲン線維が格子状に配列した比較的堅固な組織である。長時間の界面活性剤処理はコラーゲン線維の配向を乱し、組織自体を溶解してしまうため、通常の界面活性剤法による脱細胞化は難しい。しかし、超高静水圧印加法を適用することによって、線維配向を乱すことなく脱細胞化を達成する技術を開発した。東京医科歯科大学で、脱細胞化ブタ角膜のラビット角膜位への置換移植実験を行った結果、拒絶反応はなく、透明な再生角膜を得ることができるという結果を得ている。

3. 動脈バイオスキャフォールド

さらに筆者らは、バイオスキャフォールドの新たな作製方法についても検討を行ってきた。弾性線維の豊富な動脈組織から、ドナー由来細胞のみならず、酵素法によって弾性線維をも除去することによって、コラーゲンのみからなるバイオスキャフォールドを作製することが出来る(図9)。熱架橋によってコラーゲンの力学強度を向上させることで、動脈移植に必要な強度と縫糸耐性を付与している。動脈組織の大部分を占める弾性線維を分解除去したことで、非常にポーラスな構造体が得られており、そのこと

が移植後早期の再細胞化を可能にしている。

同方法によってミニブタ動脈組織から動脈再生用バイオスキャフォールドを作製し、同種ミニブタ大動脈位への置換移植を行った。移植3カ月後組織の外観と組織染色写真を図10に示した。スキャフォールド内は無数の平滑筋細胞で再細胞化されている様子が確認できる。

別法で作製した動脈バイオスキャフォールドをミニブタ動脈位へ移植し、1カ月後に外植したものの組織染色写真を図11に示した。レシピエント細胞の迅速な浸潤と並行して、再細胞化領域に血管が新生されている様子を見ることが出来る。バイオスキャフォールド内のドナー血管跡が再血管化されたのか、あるいはレシピエント血管が新生されたのかは、現時点では確認できていない。しかしながら、血管跡や神経跡が細胞へのシグナルとなって再組織化を促進する可能性も指摘されている。血管網を有する組織を*in vitro*で作製するために、バイオスキャフォールド内に残存する血管跡を積極的に利用することは出来ないだろうか。

先述のとおり、バイオスキャフォールドの問題点の一つとして、石灰化があげられる。この動脈バイオスキャフォールドは“石灰化の可能性因子を可能なかぎり除去する”という発想で開発を行い、最終的に多孔質コラーゲン構造体のみが残ったものである。この多孔性は、結果的に細胞浸潤を加速し、移植後早期の再細胞化を可能にした。大動物への移植実験により、効果的に石灰化を抑制できることも確認している。

しかしながら、少数ではあるが偶発的に不全を呈する場合がある。現在のところ、これらの不全が動脈バイオスキャフォールド自体に起因するものなのか、ドナー組織に内在するものなのか、あるいはレシピエント固体の性質によるものなのかは解明できていない。異種動物由来のコラーゲン自体がレシピエント免疫細胞を引き付けるとする研究⁵⁹⁾や、石灰化を生じるかどうかは異種によるとする研究⁶⁰⁾があるため、今後の異種移植実験へ向けて改良していかなければならない。

おわりに

世界の研究動向で述べたとおり、ドイツではバイオスキャフォールドをヒトへ移植して、レシピエントの成長に追従した移植弁の成長が報告されている。また、日本や欧米の大学でも前臨床試験が盛んに行われている。それにもかかわらず、国内外の再生医療、組織工学に関する書籍にバイオスキャフォールドに関する詳しい記述は皆無である。このような現状の背景には、バイオスキャフォールドには生体由来ゆえの未解明要素や不確定要素が含まれており、統一的な見解や方法論が確立していないという事情があるように思われる。

しかしながら、適切なバイオスキャフォールドによって、組織再生を促進する適切な足場を提供できることは確かである。今後、バイオスキャフォールドを利用した再生医療の研究が増えることを期待したい。また、再生医療に関する現行の法規制のなかにあつて、バイオスキャフォールドは最も臨床応用に近い位置にあるマテリアルの一つである。バイオスキャフォールドのポテンシャルをいち早く臨床の現場で発揮させられるよう、筆者らも努力をつづけていきたい。

本稿の当初の目的は、筆者らの研究成果をアピールすることであったが、バイオスキャフォールドというマテリアル自体の潜在能力をアピールする機会と捉えなおし、そのことに紙面の多くを割いてしまったことをお詫びしなければならない。今後、筆者らの研究グループをはじめ、国内外のバイオスキャフォールド研究の成果にご期待いただければ幸甚である。

この研究は、厚生労働科学研究費、文部科学研究費、科学技術振興調整費、循環器病研究委託費によって行いました。この場を借りて御礼申し上げます。

文献

- 1) Vacanti JP et al. : Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymer as matrices. *J Pediatr Surg* 1988, 23 : 3-9.
- 2) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007, 131 : 861-

- 3) Hynes R : Integrins : versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992, 69 : 11-25.
- 4) 久保木芳徳, 藤沢隆一, 滝田裕子 : 人工細胞外マトリックス. ティッシュエンジニアリング2007. (田畑泰彦, 岡野光夫・編), 日本医学館, 東京, 2007, p100-108.
- 5) 坂谷 知, 扇敏伸治, 竹下温子, 李 洪川, 八木静男・他 : 異種移植とブタ内在性レトロウイルス. *アニテックス* 2002, 14 : 83-90.
- 6) Adachi E, Hopkinson I, Hayashi T : Basement-membrane stromal relationships. Interactions between collagen fibrils and lamina densa. *Internat Rev of Cytology* 1997, 173 : 73-156.
- 7) 林 利彦 : IV型コラーゲン会合体のティッシュエンジニアリングにおける利用価値. ティッシュエンジニアリング2007. (田畑泰彦, 岡野光夫・編), 日本医学館, 東京, 2007, p75-81.
- 8) 林 利彦, 廣瀬志弘, 水野一乘, 中里浩一 : 細胞外マトリックスとティッシュ・エンジニアリング. ティッシュ・エンジニアリング. (上田 実・編), 名古屋大学出版会, 名古屋, 1999, p20-31.
- 9) Frederick S, Robert L : Pathological calcification of biomaterials. biomaterials science. (ed. DB Ratner, AS Hoffman, FJ Schoen, JE Lemons), Elsevier Academic Pr, California, 2004, p439-453.
- 10) Simionescu D : Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves : challenges and perspectives. *Expert Opin Biol Ther* 2004, 4 : 1971-1985.
- 11) Meuris B, Ozaki S, Herijgers P, Verbeke E, Flameng W : Influence of species, environmental factors, and tissue cellularity on calcification of porcine aortic wall tissue. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2001, 13 : 99-105.
- 12) Valente M, Bortolotti U, Thiene G : Ultrastructural substrates of dystrophic calcification in porcine bioprosthetic valve failure. *Am J Pathol* 1985, 119 : 12-21.
- 13) Simionescu A, Simionescu D, Vyavahare N : Osteogenic responses in fibroblasts activated by elastin degradation products and transforming growth factor- β 1 : role of myofibroblasts in vascular calcification. *Am J Pathol* 2007, 171 : 116-123.
- 14) Bailey M, Pillarisetti S, Jones P, Xiao H, Simionescu D et al. : Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification. *Cardiovasc Pathol* 2004, 13 : 146-155.
- 15) Ogle M, Kelly S, Bianco R, Levy R : Calcification resistance with aluminum-ethanol treated porcine aortic valve bioprostheses in juvenile sheep. *Ann Thorac Surg* 2003, 75 : 1267-1273.
- 16) Vyavahare N, Ogle M, Schoen F, Levy R : Elastin calcification and its prevention with aluminum chloride pretreatment. *Am J Pathol* 1999, 155 : 973-982.
- 17) Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P et al. : Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 1999, 285 : 1236-1241.
- 18) Popp SK, Mann DA, Milburn PJ, Gibbs AJ, McCullagh PJ et al. : Transient transmission of porcine endogenous retrovirus to fetal lambs after pig islet tissue xenotransplantation. *Immunol Cell Biol* 2007, 85 : 238-248.
- 19) Edamura K, Nasu K, Iwami Y, Nishimura R, Ohgawara H : Prevalence of porcine endogenous retrovirus in domestic pigs in Japan and its potential infection in dogs xenotransplanted with porcine pancreatic islet cells. *J Vet Med Sci* 2004, 66 : 129-135.
- 20) Herring C, Cunningham DA, Whittam AJ, Fernández-Suárez XM, Langford GA : Monitoring xenotransplant recipients for infection by PERV. *Clin Biochem* 2001, 34 : 23-27.
- 21) Byrne GW, McCurry KR, Kagan D, Quinn C, Logan JS et al. : Protection of xenogenic cardiac endothelium from human complement by expression of CD59 or DAF in transgenic mice. *Transplantation* 1995, 60 : 1149-1156.
- 22) Miyagawa S, Shirakura R, Matsumiya G, Nakata S, Seya M et al. : Possibility of prevention of hyperacute rejection by DAF and CD59 in xenotransplantation. *Transplant Proc* 1994, 26 : 1235-1238.
- 23) Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Ayares DL et al. : Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002, 20 : 251-255.
- 24) Galili U, Tanemura M : Significance of α -Gal (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) epitopes and α 1,3 galactosyltransferase in xenotransplantation. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 1999, 11 : 317-327.
- 25) Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Simon P et al. : Presence and elimination of the xenoantigen Gal (α 1,3) Gal in tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng* 2005, 11 : 1274-1280.
- 26) Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D, Konertz W : Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg* 2007, 84 : 729-736.
- 27) Dohmen PM, Hauptmann S, Terytze A, Konertz W : *In-vivo* repopularization of a tissue-engineered heart valve in a human subject. *J Heart Valve Dis* 2007, 16 : 447-449.
- 28) Dohmen PM, da Costa F, Holinski S, Lopes SV, Konertz W : Is there a possibility for a glutaraldehyde-free porcine heart valve to grow? : *Eur Surg Res* 2006, 38 : 54-61.
- 29) Erdbrügger W, Konertz W, Dohmen PM, Posner S, Pauli G : Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential *in vivo*. *Tissue Eng* 2006, 12 : 2059-2068.
- 30) Dohmen PM, da Costa F, Yoshi S, Lopes SV, Konertz W : Histological evaluation of tissue-engineered in the juvenile sheep model : in there a need for *in-vitro* seeding? *J Heart Valve Dis* 15 : 823-829, 2006.
- 31) Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Haverich A et al. : Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 2006, 114 : I132-I137.
- 32) Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Haverich A et al. : Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation* 2006, 114 : I559- I565.
- 33) Lichtenberg A, Cebotari S, Tudorache I, Sturz G, Haverich A et al. : Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves. *J Heart Valve Dis* 2006, 15 : 287-293.
- 34) Leyh RG, Wilhelm M, Rebe P, Fischer S, Haverich A et al. : *In vivo* repopulation of xenogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg* 2003, 75 : 1457-1463.
- 35) Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Haverich A et al. : Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits : *in vivo* restoration of valve tissue. *Circulation* 2000, 102 : III 50-III 55.
- 36) Knight RL, Wilcox HE, Korossis SA, Fisher J, Ingham E : The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. *Proc Inst Mech Eng* 2008, 222 : 129-143.
- 37) Knight RL, Booth C, Wilcox HE, Fisher J, Ingham E : Tissue engineering of cardiac valves : re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells. *J Heart Valve Dis* 2005, 14 : 806-813.
- 38) Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Ingham E, Fisher J : *In-vitro* assessment of the functional performance of the decellularized intact porcine aortic root. *J Heart Valve Dis* 2005, 14 : 408-421.
- 39) Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Simon P et al. : Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis* 2006, 15 : 278-286.
- 40) Kasimir MT, Weigel G, Sharma J, Rieder E, Simon P et al. : The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering : platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost* 2005, 94 : 562-567.
- 41) Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, Eichmair E, Simon P et al. : Tissue engineering of heart valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation* 2005,

- 111 : 2792-2797.
- 42) Vincentelli A, Wautot F, Juthier F, Fouquet O, Jude B et al. : *In vivo* autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve : are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007, 134 : 424-432.
 - 43) Lindberg K, Badylak SF : Porcine small intestinal submucosa (SIS) : a bioscaffold supporting *in vitro* primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins. *Burns* 2001, 27 : 254-266.
 - 44) Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, Badylak SF : Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype *in vitro* using organ-specific extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng* 2007, 13 : 2301-2310.
 - 45) Freytes DO, Martin J, Velankar SS, Badylak SF : Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials* 2008, 29 : 1630-1637.
 - 46) Freytes DO, Stoner RM, Badylak SF : Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008, 84 : 408-414.
 - 47) Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF : The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng* 2006, 12 : 519-526.
 - 48) Badylak SF, Gilbert TW : Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol* 2008, 20 : 109-116.
 - 49) Badylak : The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 2007, 28 : 3587-3593.
 - 50) Badylak SF : Regenerative medicine and developmental biology : the role of the extracellular matrix. *Anat Rec B New Anat* 2005, 287 : 36-41.
 - 51) Iwai S, Torikai K, Coppin CM, Sawa T : Minimally immunogenic decellularized porcine valve provides *in situ* recellularization as a stentless bioprosthetic valve. *J Artif Organs* 2007, 10 : 29-35.
 - 52) Ueda Y, Torrianni MW, Coppin CM, Iwai S, Sawa Y et al. : Antigen clearing from porcine heart valves with preservation of structural integrity. *Int J Artif Organs* 2006, 29 : 781-789.
 - 53) Ota T, Takekani S, Iwai S, Miyagawa S, Sawa Y et al. : Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and γ irradiation. *Ann Thorac Surg* 2007, 83 : 1501-1507.
 - 54) 尾崎重之, 岩崎清隆, 大関泰宏, 山下裕正, 岡田良晴・他 : 組織細胞工学を応用したハイブリッド動脈弁の研究開発. *日本再生医療学会雑誌* 2007, 6 : 204.
 - 55) Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Simon P et al. : Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficacy cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004, 127 : 399-405.
 - 56) Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, Kirsch L, Haverich A et al. : Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis* 2007, 16 : 567-573.
 - 57) Ott H, Matthies T, Goh S, Black L, Taylor D et al. : Perfusion-decellularized matrix : using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2007, 14 : 213-221.
 - 58) Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Simon P et al. : Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* 2003, 26 : 421-427.
 - 59) Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, Simon P, Weigel G : Tissue engineering of heart valves : decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation* 2005, 111 : 2792-2797.
 - 60) Afonso da Costa FD, Dohmen PM, Lopes SV Lacerda G, Afonso da Costa J et al. : Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. *Artif Organs* 2004, 28 : 366-370.

Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents

Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, and Akio Kishida*

To control the cross-linking rate of the collagen gel, ethanol/water co-solvent was adopted for the reaction solvent for the collagen microfibril cross-linking. Collagen gel was prepared by using 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) as coupling agents. Ethanol did not denature the helical structure of the collagen and showed the prevention of the hydrolysis of EDC, but showed the protonation of carboxylate anions. In order to control the intra- and interhelical cross-link of the collagen triple helix, mole ratio of carboxyl group/EDC/NHS, and the ethanol mole concentration was altered. Increase in the EDC ratio against the carboxyl group increased the cross-linking rate. Furthermore, the increase in the ethanol mole concentration against the water brought increase in the cross-linking rate until ethanol mole concentration is 0.12 (ethanol concentration 30%, v/v), but showed gradual decrease as the ethanol mole concentration increased further. This is because the adsorption of solvent by the collagen gel, protonation of carboxylate anion, and hydrolysis of EDC is at its most optimum condition for the coupling reaction when the ethanol mole concentration is 0.12.

Keyword collagen, cross-linking, ethanol.

Based on the fact that an ECM mainly composed of collagen and elastin, many researchers have attempted to prepare a collagen- or elastin-based material to construct an ECM. However, the critical aspect in using collagen gel is that its mechanical strength is too small and easily deforms its triple-helix structure into a random coil structure when heated. The low mechanical strength and easy deformability make collagen shrink easily due to external stimuli. These aspects make it difficult to use collagen as an ECM. The use of cross-linkers to overcome these problems was investigated and is well reviewed by Khor.¹⁾ By cross-linking collagen triple-helices, it is possible to maintain its mechanical strength and suppress any deformation caused by external stimuli. However, it is very important to consider biological responses in the designing stage of a cross-linking process because of the possibilities of severe problems such as toxicity, inflammatory response or the alteration of protein structure.

A intrahelical cross-linking method using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) in aqueous condition is a one of the best method to produce a non-toxic collagen product (Figure 1). However, it is regarded as an inappropriate method, especially in tissue engineering, owing to its extremely low coupling efficiency. This is because EDC tends to hydrolyze in aqueous conditions within a short time span.²⁻⁶⁾ The use of NHS to suppress the hydrolysis does not function to the desired extent. Furthermore, since collagen consists of triple helices, the efficiency of the coupling reaction is lower than that of cross-linkers such as diol-related cross-linkers or glutaraldehyde because the only possible reactions are the intra- and interhelical coupling reactions. Hence, the

question of whether it is possible to control the coupling reaction rate of EDC for collagen cross-linking was brought up.

We attempted to control the EDC/NHS coupling reaction rate by making the reaction environment highly hydrophobic. To achieve the hydrophobic environment, we used ethanol, which is miscible with water. Ethanol/water mixed solvents were prepared in different mole concentrations to control the hydrophobicity of the solvent. However, we are not yet sure on how ethanol would affect the collagen molecules. The structure of collagen is known to depend on the concentration of the alcohols, because an increase in the hydrophobic interactions between the solvent and collagen stabilized the structure of collagen.⁷⁾ The hydrophobic interactions between the non-polar amino acid side chains are also very important factors that contribute to the stabilization of the helices. Figure 2 shows how the solubility of the collagen molecules would differ according to the solvent. The collagen solution would dissolve completely until ethanol mole concentration is 0.32 (ethanol/water = 6/4 v/v). Then the aggregation of the collagen molecules starts to appear when the $N_A \approx 0.42$ (ethanol/water = 7/3 v/v). The collagen precipitate as the ethanol concentration increases further. It should be noted that this is different from fibrillogenesis which is the regular alignment of the collagen molecules. It was assumed that this is because of the dehydration, but how is dehydration related to the aggregation and precipitation?

We checked this phenomenon by characterizing the triple helix of the collagen. The exposure of the collagen triple-helices to ethanol induces hydrophobic interactions, which may lead to a change in the conformation of the

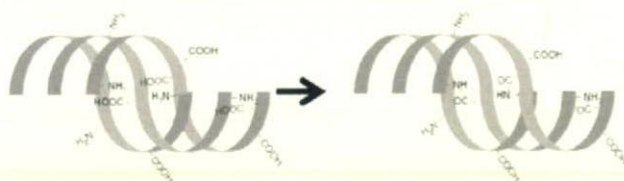


Figure 1. Intracross-linking of the collagen triple helix by EDC.



Figure 2. Change in the solubility of collagen according to the ethanol mole concentration.

collagen microfibrils. Using a circular dichroism (CD)

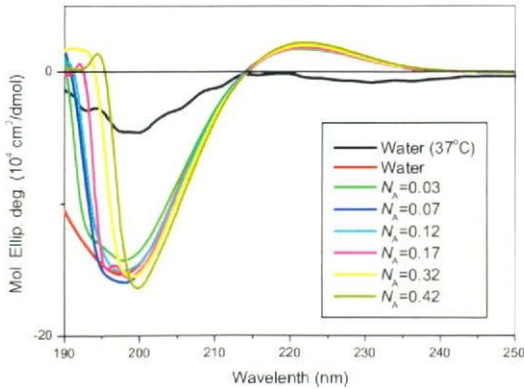


Figure 3. CD spectra of the collagen microfibrils under various ethanol mole concentrations.

spectrometer, we observed the conformation structure of collagen in the range of $N_A \approx 0\text{--}0.42$. The increase in ethanol concentration against water did not bring about any distinguishable change in the triple helical structure (Figure 3). The positive band and the cross-band seen in the CD spectra were the same for all the tested samples ($N_A \approx 0\text{--}0.42$). No signs of denaturation, such as decrease in the peak intensity of positive and negative band, were detected.⁸⁻⁹ Hence, it is assumed that ethanol does not change the triple helices into random coils.¹⁰ The main forces that hold the helical structure of collagen are hydrogen bonds, electrostatic interactions, and hydrophobic interactions. In water, the hydrogen bonds and electrostatic interactions within collagen contribute to the stabilization of the helices, but they are not the dominant factors. Exposure of the non-polar amino acid side chains to the outer side would induce hydrophobic interactions, which were not observed under aqueous conditions. This causes a hydrophobic shielding effect.¹⁰ In the case of ethanol, the secondary and the quaternary structures of collagen would be affected.^{10,11} As result, it is assumed that the 'triple helix→random coil' does not occur, and the use of ethanol for the amide coupling reaction for collagen cross-linking is preferable. This can be observed much clear when the collagen molecules incubated in the 37°C is compared.

However, it should be noted that the use of ethanol is not a solution for the control of the coupling reaction. The surface of collagen is too hydrophobic and rigid, in which

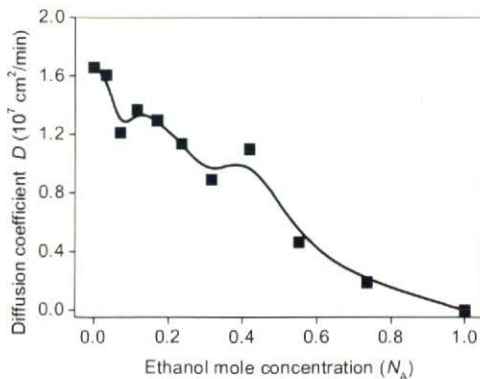


Figure 4. Change in the diffusion coefficient D of collagen gel according to ethanol mole concentrations.

the fibrillar structure disappears. The solubility test showed that the ethanol mole concentration should be at least 0.42 to dissolve collagen. The same phenomenon was observed for the collagen film. The collagen film, which is uncross-linked, could be dissolved at $N_A \approx 0.42$, but would remain undissolved in higher hydrophobic conditions. Expectedly, the time required for complete dissolution was different, where high-hydrophobic conditions delayed the dissolution time. This suggests that for the collagen film, the adsorption of ethanol by the collagen gel would be extremely low. To prove this, we have calculated the diffusion coefficients D for various mole concentrations of ethanol, as shown in Figure 3, using the collagen gel cross-linked with EDC/NHS in a 2-morpholinoethane sulfonic acid (MES) buffer that was prepared by the method reported previously.⁴ This shows that the D of the solvent decreases rapidly when $N_A \geq 0.55$ (ethanol/water = 8/2, v/v); furthermore, the D value of pure ethanol ($1.2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{min}$) is approximately 1400 times lower than that of pure water. This directly affects the cross-linking ability. The solvent adsorption ability in pure ethanol and at $N_A \approx 0.74$ (ethanol/water = 9/1, v/v) is about 50% of that of pure water and 80% at $N_A \approx 0.55$ after 24 h of solvent adsorption. This implies that ethanol could not completely reach the interior of the collagen gel throughout the cross-linking procedure.

Using EDC and NHS, we obtained cross-linked collagen gels under various ethanol concentrations (Figure 4). When EDC and NHS are used for the cross-linking process, the highest the lowest value of the free amine group content was approximately 45% (60% when cross-linked in MES buffer). This can be achieved when the cross-linking was executed for 24 h at $N_A \approx 0.07\text{--}0.17$ (ethanol/water = 2/8~4/6, v/v) with 51 mmol of EDC. This range is assumed to be the most proficient range for the coupling reaction, where the suppression of hydrolysis and fast solvent absorption has occurred. The addition of ethanol is thought to have prevented the hydrolysis of EDC. On the other hand, when $N_A \approx 0.24$ (ethanol/water = 5/5, v/v), the free amine group content increases again, and from $N_A \approx 0.42$ to higher, the free amine group content increases to higher than that of pure water. This is because of the decrease in the number of carboxyl groups reacting with EDC.^{12,13} The reactivity of the carboxyl groups decreases as the ethanol concentration increases because EDC reacts with the carboxylate anions.

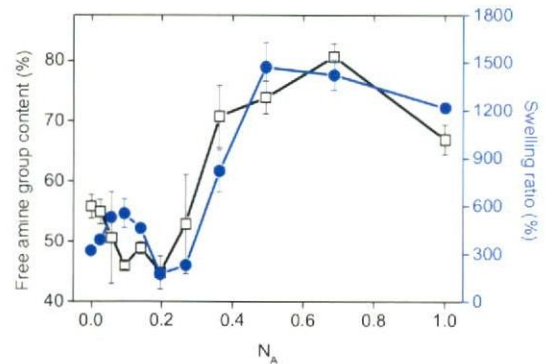


Figure 5. Change in the reacted amine group contents and swelling ratio of collagen gel according to ethanol mole concentrations.

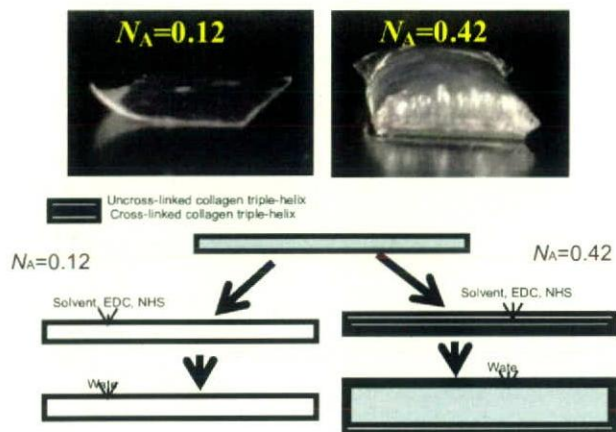


Figure 6. Swelling of the collagen gels in pure water after the coupling reaction in different ethanol mole concentrations (above) and the schematic picture of the swelling by the high ethanol concentration (below).

The increase in the number of neutral carboxyl groups would lead to relatively low *o*-isoacylurea formation.⁵⁾ Furthermore, when $N_A \geq 0.42$, the cross-linking is assumed to be mainly concentrated on the surface of the collagen gel. That is, the partly cross-linked network of the collagen gel could be mainly located on the surface of the gel. This can be confirmed when the collagen gels prepared at $N_A \geq 0.42$ are placed in pure water. As shown in Figure 5 (blue line) and Figure 6, the sudden change in the environment causes the gel to adsorb a large amount of water, which makes the uncross-linked collagen microfibrils dissolve and expand to the maximum extent by an increase in the free energy. The expansion of the collagen microfibrils is obstructed by the cross-linked part, which is mainly located on the surface. For the collagen gel prepared at $N_A \approx 0.42$, D is approximately the same as that of the gel prepared at $N_A \approx 0.32$, but it is thought that the protonation of the carboxyl groups prevents the formation of *o*-isoacylurea. The reactivity between the carboxyl groups and alters the formation of the collagen gel. When the morphology of the razor-cut surface was observed, the monolithic morphology of the collagen gel was found to form a layered structure as the hydrophobicity increased, which eventually collapses. The collapse of the inner part of the collagen gel is due to the dissolution of the uncross-linked collagen microfibrils (Figure 5 (below)). This implies that the cross-linking of the collagen gel would start from the surface and then occur inside the collagen gel. Furthermore, it is possible to cross-link only the surface of the collagen gel to obtain a phase-separated collagen gel when the ethanol concentration is controlled.

In conclusion, we have proposed a new method for controlling the coupling reaction rate using EDC and NHS for collagen cross-linking. The collagen triple-helix was stable in ethanol/water mixed solvent, but the properties of the collagen gel prepared in the above solvent could be altered by the ethanol mole concentration. We also discovered that the coupling reaction begins from the surface of the collagen gel. The coupling reaction was limited to the surface of the collagen when $NA > 0.55$; this

was because of the slow penetration of EDC and NHS caused by the high-ethanol environment and the decrease in the number of carboxylate anions. It is thought that the same procedure could be repeated not only in collagen but also in collagen-based materials such as body tissue and proteins.

Experimental

The preparation of the collagen film was executed using 0.5 wt% of collagen type I solution (I-AC, KOKEN, Tokyo, Japan) was made into a 2 wt% collagen type I solution and used for the film preparation. The collagen solution was dropped onto the polyethylene film and dried at room temperature. A transparent film with a thickness of $56 \pm 3 \mu\text{m}$ was obtained. The films were stored in a dry environment. The preparation method of the collagen gel using EDC and NHS is same as reported elsewhere.^[4,6,14]

A solubility test was executed in the ethanol/water mixed solvents. The collagen films and collagen chunks obtained from lyophilization were immersed in ethanol/water mixed solvents. The collagen solutions were left at room temperature until complete dissolution occurred. The triple-helix structure was characterized using a circular dichroism (CD) spectrometer (J-720W, Jasco, Tokyo, Japan). Collagen solution was prepared at a concentration of $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ and characterized 5 times for each sample to obtain the average spectra. Surface analysis was performed by scanning electron microscopy (SEM, SM-200, Topcon, Tokyo, Japan). The same solubility test was repeated using the collagen film. The diffusion coefficient D was calculated using a collagen gel that was prepared in an MES buffer. The collagen gels were immersed in the ethanol/water mixed solvents at pH 9.0. The gels were then removed at 10, 60, 120, 240, 360, 1440, and 4320 min (3 d) and the adsorbed amounts of the solvent were measured.

The primary amine group concentrations in the tissue samples were determined using a colorimetric assay.¹⁴⁾ 2–4 mg of each sample was prepared. These samples were immersed in a 4 wt% NaHCO_3 aqueous solution (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan) and 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). Then, 0.5 wt% TNBS aqueous solution was added (Wako chemicals, Osaka, Japan). The reaction was continued for 2 h at 40 °C, after which the samples were rinsed in saline solution using a vortex mixer to remove the unreacted TNBS. The samples were freeze-dried overnight, after which the dry mass was determined. The dry samples were immersed in 2 mL of 6 M aqueous HCl until fully dissolved. The obtained solution was then diluted with distilled water (8 ml) and the absorbance was measured at 345 nm (V-560, Jasco, Tokyo, Japan). The experiment was repeated five times and the average along with the standard deviation was calculated.

References

- 1) E. Khol, *Biomaterials* **1997**, 18, 95.
- 2) C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827.
- 3) L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Biomaterials* **1996**, 17, 765.

- 4) K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Biomaterials* **2007**, 28, 1.
- 5) N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjugate Chem.* **1995**, 6, 123.
- 6) K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Biomaterials* **2007**, 28, 3153.
- 7) E. Bianchi, A. Rampone, A. Ciferri, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3341.
- 8) Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *Biopolymers* **1996**, 39, 859.
- 9) Y. Imanishi, N. Kawazoe, K. Ichizawa, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Phys.* **2003**, 41, 3632.
- 10) A.E. Russel, D. R. Cooper, *Biochemistry* **1969**, 8, 3980.
- 11) Y. Imanishi, N. Kawazoe, K. Ichizawa, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Phys.* **2003**, 41, 3632.
- 12) K. Sarmini, E. Kenndler, *J. Chromatogr., A* **1998**, 811, 201.
- 13) A. Doğan, E. Kılıç, *Anal. Biochem.* **2007**, 365, 7.
- 14) K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Macro. Biosci.* **2008**, 8, 32.