

バイオテクノロジーシリーズ

ヘルスケアとバイオ医療の ための先端デバイス機器

Advanced Bio/Medical Devices
and Equipments for Health Care

監修：三林浩二

Supervisor : Kohji Mitsubayashi

HIGH TECHNOLOGY
INFORMATION

シーエムシー出版

第12章 再生医療デバイス

岸田晶夫*

1 はじめに

再生医療 (Regenerative Medicine) は1970年代より行われている人工皮膚の研究に端を発し、1992年のLangerとVacantiによる「Tissue Engineering (組織工学)」の概念の発表で研究領域として確立した¹⁾。この時点では、新しい医療技術の可能性として認知されていたが、その後、1998年のヒトES細胞の開発によってBig Scienceの仲間入りを果たした。もともと組織工学および再生医療の基本的な考えは、組織および臓器が破綻しておこる重篤な疾患について、臓器移植、人工臓器の適用が不可能なものの治療法と考えられていたが、昨今では、高QOLあるいは医療従事者の負担減などの新しい考えを取り入れて発展している。

「再生医療デバイス」という表現については、2通りの解釈が存在する。1つは、再生医療を支えるデバイスであり、もう1つは再生医療技術によって作成されたデバイスである。現在はこれらの解釈が混同されて私用されているが、再生医療の普及とともに整理されてゆくものと考えられる。本稿では双方について紹介するとともに、再生医療製品としてすでに臨床応用されており、将来性も期待されている動物由来組織の応用について、筆者の取り組みを中心に紹介する。

2 再生医療技術の現状について

現在の再生医療については、ひとことで言い表すことができないほど多様な考え方、方法論、および技術が提案されている。大まかではあるが、まとめると図1ようになる。これらを簡単に紹介する。

2.1 細胞移植

細胞を単独で使用する方法は「細胞移植」と呼ばれ、広義では白血病治療のための骨髄移植を含めるが、一般的には末梢循環改善や心筋機能回復を目的として、自己幹細胞を注入する技術である。

* Akio Kishida 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

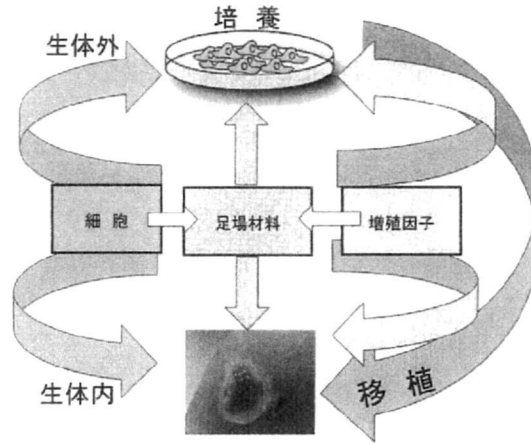


図 1

2.2 細胞単独での組織再構築

細胞シート工学に代表される、細胞自身が産生するタンパク質による基底膜あるいはマトリクスを利用する技術である。

2.3 足場材料 (Scaffold: スキャフォールド) を用いる技術

足場材料を用いる技術にはいくつかのバリエーションがある。

① 足場材料をそのまま移植するもの

生体組織からの細胞浸潤とそれによる組織再構築を期待するもの。細胞を使用しないために、安全性が高く、また技術的にも容易である。

② 足場材料に細胞を播種して直ちに使用するもの

手術室で患者から細胞を取り出し、足場材料に播種した後に直ちに生体内に埋めこむ。幹細胞を選別したり、接着を促すために数時間、培養したりする場合もある。いずれの場合にも、足場材料自身が細胞を含まないため、①の技術同様に、臨床応用までの過程が短い、安全性が比較的高い、などの特徴がある。

③ 足場材料に細胞播種して生体外で組織再構築を行うもの

患者から取り出した細胞あるいはES細胞およびiPS細胞のような幹細胞を組み込み、生体外で長期間培養することによって、ある程度組織構築をすすめたものを治療用途に用いるもの。生体外で培養するために、高度な安全環境、輸送・取り扱いの技術、細胞の品質チェックなど、様々な制約が生じる。生体内に用いられた時点で機能を発揮することが期待でき、また組織構築の過程が患者の状態によらないため、比較的均質な成果を挙げることができると期待されている。

2.4 成長因子について

成長因子は、細胞、足場材料と並ぶ再生医療の三要素の一つである。広義の再生医療には、成長因子のみの投与による微小循環再構築なども含まれるが、本稿では省略する。詳細は他書を参照されたい²⁾。

3 再生医療を支えるデバイス

再生医療は研究開発の当初から、種々のデバイスによる支援を受けてきた。多くの先進医療がそうであるように、再生医療の発展は、周辺技術の発展と密接に関連しており、現在でも日々進化を続けている。本稿では工学技術による支援デバイスについては簡単に紹介するにとどめる。

3.1 細胞分別装置

再生医療において最も注目されている要素は細胞である。ヒト ES 細胞が報告されるまでは、多くの研究者が成人組織からの細胞の調達を考えていた。繊維芽細胞、軟骨細胞や肝細胞などは比較的容易に得られ、培養法などが研究されていた。しかし、研究室レベルで必要な細胞数と、治療に必要な細胞数では 1000 倍以上違っており、それだけ細胞を増殖させることは、細胞の変異や品質管理の点で問題があり、また肝細胞など増殖そのものが困難なものもあった。幹細胞はその問題解決に有効であることは予想されていたが、培養法も確立されておらず、また分化制御そのものが先端科学であった。その後、生体内で組織・臓器の修復を行っている細胞があるのではないかとの発表が相次ぎ、「成体幹細胞」という概念が提案され、血管内皮前駆細胞などが発見され³⁾、治療に用いられるようになった。ES 細胞や iPS 細胞は成体のほとんどの細胞に分化できる多能性を有しており、理論上ではうまく分化を制御することによって、必要な細胞を必要だけ得ることができる。これらの細胞の取り扱いを可能にした技術が細胞分別装置である。フローサイトメーター、セルソーターと呼ばれる一連の装置は、細胞を蛍光物質でマーキングし、マークの有無によって細胞を高速に分別および分取する。現在では、多色での染色による詳細な分別や超高速分別、細胞へのダメージを減ずるものなど種々の装置が登場している。また、蛍光物質の代わりに磁気ビーズでマーキングし、磁力で分別する装置は、分別したい細胞の種別が明確な場合には、非常に有力な手段である。

3.2 バイオリアクター

足場材料に細胞を組み込んだだけでは、細胞は接着しているのみで、機能を発揮していない。これを生体内環境を模した雰囲気の中で培養することによって、細胞が機能を発現し、組織を構築す

あるいはマトリク

使用しないために、

に埋めこむ。幹細胞
の場合にも、足場
い、安全性が比較的

を組み合わせ、生体外
用途に用いるもの。生
品質チェックなど、様
でき、また組織構築の
と期待されている。

ることができる。これを実現する装置がバイオリクターである。従前のバイオリクターは、例えば醸造のための発酵装置などを指し、医療用途のバイオリクターは、細胞の大量培養を目的としたものであった。再生医療の概念が提唱されて以来、バイオリクターは発展を続け、今日では、細胞、足場材料、成長因子につぐ、再生医療の第4の因子と呼ばれるようになってきている。細胞を生育させる目的で、現状でも回転フラスコ型のバイオリクターも使用されているが、現在、注目を集めているものが、生体内環境を忠実に再現できる装置である。例えば、膝関節軟骨の再構築のためにヒトの歩行時の圧力付加を再現できるもの⁴⁾、心臓弁再生のために拍動流によって培養するもの⁵⁾、角膜上皮再生のために気液境界面での培養を可能にしたものなど、目的に応じた高機能な装置が開発されている。

3.3 足場材料

(1) 足場材料の背景

ヒトを始め、生物は「組織」によって形作られている。皮膚や内臓は「軟組織」、骨や歯は「硬組織」という。組織工学は、生物を形作っている組織を工学的に再生することを目的としている。具体的には、生物を形作っている骨や耳や鼻のような組織を人間の手で作り上げることを目的としている。上述した Langer と Vacanti らの例を用いて説明すると、まず、体の中で分解・吸収されるプラスチックを加工して多孔質体にし、これを人間の耳の形に削り出す。ここに、体の中で耳の形を作っている軟骨の細胞を播種する。すると軟骨細胞は耳の形の多孔質体に接着し、増殖して軟骨を作る準備を始める。これをヌードマウスの背中に手術で埋植すると、宿主からの栄養供給をうけて軟骨細胞は軟骨を作り出す。その過程でプラスチックは分解してしまい、軟骨細胞と軟骨からなる組織が生成する。これを取り出して移植すると、ヌードマウスの細胞はヒトの免疫系によって速やかに排除され、患者の耳が再生することになる。軟骨細胞だけをマウスに植えても軟骨は生成するものの、耳の形を自ら形作ることはない。これは軟骨細胞には軟骨を作り出す能力はあるが、耳の形を作り上げる能力が欠けているためである。軟骨細胞を耳の形の材料に接着させ、形状についての情報をあらかじめ設定しておき、再生が終わる頃には材料は分解・吸収されて消失しており、この過程を建築になぞらえて形状の情報を与える材料を「足場材料 (Scaffold)」とよぶ。

(2) 足場材料に必要な性質

細胞足場材料に必要な性質は次のようなものである。①生体内分解性：体の中で分解して消失する特性である。素材自体だけでなく、分解して生成する化合物も生体にとって安全なものではない。この特性が足場材料に必須であるかどうかは、まだ議論が残されている。分解性が必要であるとの根拠は、多くの材料は生体内で異物反応を引き起こしたり、物性の不一致に

よって破断あるいは
きる材料が開発さ
の組織のうち、力
という疑問が示さ
度の維持を両立さ
編み物状など種々
に形状を維持する
して増殖できる特

(3) 足場材料の

① 生分解性合
生体内で分解・
の共重合体である
性を有している。
る。細胞接着性
れている。

② コラーゲ
医療用コラー
ク質である。特
のはI型コラー

よって破断あるいは過度の生体反応を引き起こしたりする、というものである。それらを解決できる材料が開発されたとき、この特性は再考される可能性がある。また、最近の研究では、生体の組織のうち、力のかかる部分の再生については、分解性の材料では耐えきれないのではないか、という疑問が示されている。そこで分解性材料と非分解性材料を組み合わせ、組織の再生と強度の維持を両立させる試みもある。②成形性：細胞足場材料として用いる場合には、スポンジ状、編み物状など種々の形状に加工する。細胞が内部まで入り込みやすく、また体の中に入れたときに形状を維持するための加工が可能な特性が必要である。③細胞接着性：播種された細胞が接着して増殖できる特性である。

(3) 足場材料の例

① 生分解性合成高分子

生体内で分解・吸収されるプラスチックの代表は、ポリグリコール酸、ポリ乳酸およびそれらの共重合体である(図2)。これらは脂肪族ポリエステルとよばれ、分解性を有し、優れた加工性を有している。フィルムや繊維を得ることができ、既に吸収性縫合糸として臨床応用されている。細胞接着性については特に優れているわけではなく、細胞接着性を高める研究も盛んに行われている。

② コラーゲン

医療用コラーゲンは、ブタあるいはウシから抽出されたものである。生体軟組織の主要タンパク質である。特徴的な3本鎖の構造をとり、13ほどのタイプが知られている。最も普遍的なものはI型コラーゲンで、血管内皮の基底膜はIV型コラーゲンと、組織ごとにタイプの偏在がある。

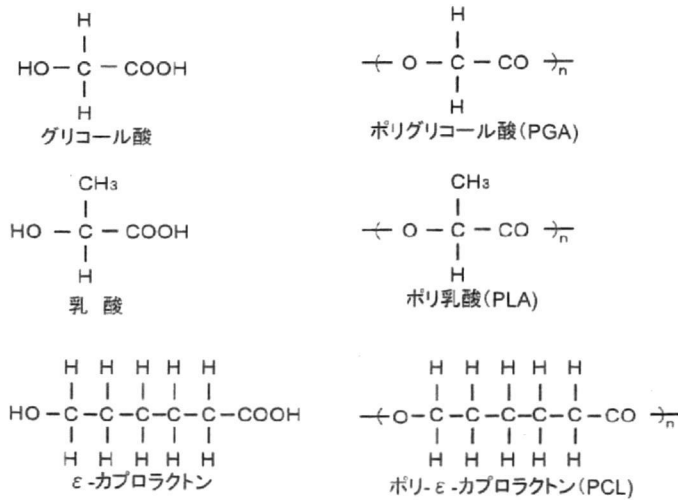


図2

現在の技術では抽出されたコラーゲンを再度、生体組織のような弾力に富んでしかも高い強度を有する材料にくみ上げることができない。架橋剤を用いて分子を強制的に結合させることはできるが、しなやかさが失われて生体との力学的適合性を失う。強度に問題があるものの、コラーゲンは優れた細胞接着性やそのほかの生理活性を有している。細胞接着性が足りないときや、高い強度が必要ない場合に使用される。人工皮膚などで、すでに臨床にも用いられている。最近では、狂牛病問題のために動物由来材料であるコラーゲンの利用については縮小する傾向にあるが、有効な代替品がないことが問題である。

③ ハイドロキシアパタイト

ハイドロキシアパタイトはカルシウムとリン酸からなる無機材料で、生体中には骨の成分として存在する。粉末や板状、スポンジ状に加工されて用いられる。ハイドロキシアパタイトは、骨の誘導活性があることが知られており、骨の再生には有効であるが欠点もある。硬くてもろいので成形加工が困難であり、また大きな力がかかる箇所には使いにくい。一方、ハイドロキシアパタイトは、骨だけでなく皮膚などの軟組織にも非常によく接着することが知られている。この性質を利用して、軟組織の足場材料としての応用が研究されている⁶⁾。

④ 生体組織

足場材料は、再生したい組織の形に成形して用いる必要がある。耳や皮膚、軟骨などは単純な構造であるが、体の中には心臓弁のように複雑な構造の組織もある。また、人工物で作成した足場材料は、多くが生体よりも硬く、物理的なミスマッチにより機能が発揮できないだけでなく、生体に悪影響を与える場合もある。これらの問題点を解決する方法として、動物（主にブタやウシ）や亡くなった方から提供されたヒト組織から、細胞を除去（脱細胞）して用いる方法が開発されている。生体組織とほとんど変わらない物性を有していることが特徴で、細胞を組み込むあるいはそのままの状態で行われている。生体組織はこれまでも化学処理（架橋）されたものが臨床応用されているが、細胞による再生が起らないため、10年程度で機能不全を起こすことが知られており、脱細胞化組織はそれらよりも優れた成績を上げることが期待されている。

4 再生医療デバイスとしての脱細胞化組織

上で紹介した脱細胞化組織については、すでに血管⁷⁾、皮膚⁸⁾、心臓弁⁹⁾など種々のものが臨床応用されている。それらは、細胞の組み込みを前提としていないため、認可などの手続きが容易であり、これまでの成績が優れているため、他の組織に波及する可能性も高い。ここでは、筆者が行っている新しい処理法を用いた脱細胞化生体組織の調整法および応用について紹介する。

4.1 研究開
新しいバイ
いて十分に
すでに既存
合あるいは
生医療とそ
我が国で
ン製の機械
用されてい
億円に達す
を含めても
れる人工臓
機械弁は
のは一生の
圧較差が大
くしたもの
い。抗凝薬
に血栓が
また、ワー
異種生
点から、
すると
tentを)
化等によ
は5~10
以上の高
欧米で
で、死体
異種生体
ら、提供
手術で
て再建

4.1 研究開発の位置づけ

新しいバイオ材料、特に再生医療に関わる材料の開発については、その必然性や位置づけについて十分に考慮する必要がある。その主たる理由は、再生医療が適用となる疾患の治療法には、すでに既存の技術が適用されていることが多く、新しく開発される再生医療技術は、これらの競合あるいは共存する必要があるためである。具体的な例として、筆者らが行っている心臓弁の再生医療とそれに用いる脱細胞化生体組織に関して紹介する。

我が国では年間約9千件の心臓弁置換術が施行されており、代用弁としてバイロライトカーボン製の機械弁が80%、ブタやウシ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁が20%使用されている¹⁰⁾。世界中では年間約30万件の置換術が施行されており、その市場規模は約1000億円に達する。術前診断や術中の体外循環技術の向上等もあり、置換術による死亡率は再置換術を含めても2%程度であり、比較的安定した成績となっている。このように最も臨床的に使用される人工臓器の一つとして確立した感のある人工弁ではあるが、未だ種々の問題点が存在する。

機械弁は1960年代初頭の実用化以来、形状や材質の改良が重ねられ、現在使用されているものは一生の使用に耐えられる物理的強度を有している。これまでに弁座部分の構造上、弁前後の圧較差が大きく、心機能や予後に影響を与えるとされてきたが、改良によって有効弁口面積を広くしたものが開発されている。しかし、機械弁では依然として抗血栓性の問題が解決されていない。抗凝固のため、生涯にわたり嚴重なワーファリン服用のコントロールが必要であり、機械弁に血栓が付着した場合には急速な弁機能不全を招くとともに、脳塞栓症を来す頻度も高くなる。また、ワーファリンが催奇形性を有することから、妊娠を希望する若年女性には使用できない。

異種生体弁も1960年代後半の登場以来、抗凝固剤の服用が不必要であるというQOL上の利点から、特に最近では使用例が増えている。従来、ステントへの固定のために有効弁口面積が減少するとともに、固定に伴うストレスが弁葉の石灰化や変成を促進するとされていたが、近年、ステントを用いないステントレス異種生体弁が導入されている。しかし、異種生体弁は依然、石灰化等による構造的劣化の問題を抱え、高齢者では15~20年程度の耐久性を有するが、若年者では5~10年程度の耐久性しか有せず、米国心臓病学会及び心臓病協会のガイドラインでは65歳以上の高齢者に使用が奨励されている。

欧米では1980年代半ばから、我が国でも近年、凍結保存による組織バンクが整備されたことで、死体から提供された凍結保存同種弁が臨床で使用されつつある。機械弁に比べて抗血栓性で、異種生体弁に比べて耐久性で、そして両者に対して抗感染性で優れているとされる。しかしながら、提供数が絶対的に不足しているのが大きな問題である。また、若年者に有効とされるRoss手術では、自己肺動脈弁を大動脈弁位に置換移植し、欠損した肺動脈弁を凍結保存同種弁によって再建するが、大動脈弁位に移植された自己肺動脈弁は患者の成長とともに増大するという特徴

がある。これに対して、機械弁や異種生体弁はもとより、凍結保存同種弁でも成長性を有しないため、小児患者の場合では再移植となる場合が多い。

以上のようなことから、自己弁と同等の抗凝固性、耐久性、成長性などを兼ね備えた次世代型の代用弁の開発が求められており、この目的に沿って再生型の心臓弁の研究が行われている。また社会的な要請として、機械弁、異種生体弁ともほぼ全量が輸入品であり、BSE問題を契機とした厚生労働省のGMP基準の改定に伴い、生体弁の輸入が一時停止するといった事態も生じている。また、競合品が存在しないために欧米と比較して価格が高く設定されており、我が国の医療における安全保障の観点からも、日本発の技術開発による日本製の安全な代用弁の登場が望まれている。このような背景を基盤として、我々は研究戦略を構築している。

4.2 テーラーメイド生体組織による再生医療—心臓弁を例に—

脱細胞化生体組織を用いた先駆例としては、米国 CryoLife 社による SynerGraft 心臓弁がある。1999 年から脱細胞化ブタ大動脈弁の臨床使用を開始し、2001 年には世界初の再生型心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数ヶ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告している¹¹⁾が、移植後に破断の生じた例も報告されている。ドイツ・ハノーバー医科大学の Haverich らは、1998 年より異種生体弁から動物由来細胞を除去し、代わりにレシピエントの自己血管内皮細胞を播種する動物実験を行い、界面活性剤である TritonX-100 やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている¹²⁾。英国リーズ大学の Ingham らは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDS が最も細胞除去に適していると報告している¹³⁾。また、ドイツ・フンボルト大学の Konertz らはヒツジを用いた 6 ヶ月間の実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を播種することで弁の変形や石灰化も見られなかったと報告しており、臨床使用も開始している¹⁴⁾。彼らの開発した心臓弁は、ドイツのベンチャー企業 AutoTissue 社から 2006 年に市販が開始され、これまでに 400 例以上の治療を実施したと報告されている。

ほとんどのグループは界面活性剤やタンパク分解酵素等の薬液処理によって細胞を除去している。筆者らは当初、TritonX-100 溶液による界面活性剤浸漬処理を検討した。その結果、厚さ数百 μm の弁葉内においては処理 6 時間後には細胞核は染色されなくなったが、弁葉基部の組織内細胞の核は処理 24 時間後でも表面から 1 mm 以遠の組織深部では染色されており、界面活性剤溶液の組織内浸透性が悪いためであると考えられた。また、細胞毒性を示す TritonX-100 を洗浄除去するために数週間以上の時間を要し、その間における生体力学特性の変化や汚染の危険性についても注意が必要であった。そこで我々は、より完全な細胞除去法について検討し、液体を圧力媒体として等方圧力を加える冷間等方圧加圧法による超高压印加処理法を開発した (図 3)。この方法は、媒体液中に組織を浸漬し、ピストンによって媒体液を圧縮することで圧力を印加す

る方法であり、
ブリッジマン
等での高压技術
理、加工、殺菌
合) をバックボ
合等) により、
パク質変性) が
母や芽胞をもた
エンベロープを
気圧を超えるま

4.3 超高压肺

清潔下にて
処理 (4℃, 1
ことができた
ステン線維が
て力学特性へ
脱細胞化
動脈を同所
ずれの個体
を摘出した

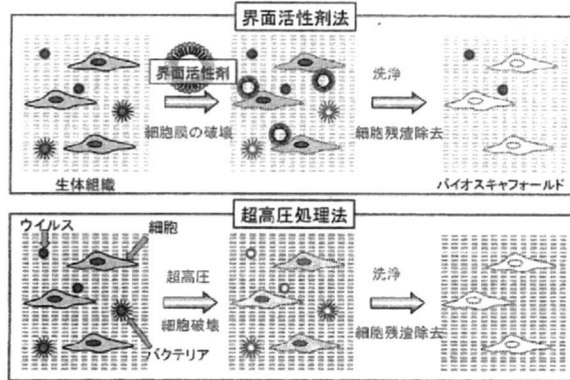


図3

る方法であり、組織の形状が維持されたまま高い圧力を加えることができる。

ブリッジマン (1882~1961) が高圧物理学を開拓して以来、無機・有機化学、医療、食品分野等での高圧技術の利用が進んでいる。特に食品分野においては、風味、栄養分の損失がなく、調理、加工、殺菌、保存できるとして注目されている。生体中のタンパク質はアミド結合 (共有結合) をバックボーンに、弱い相互作用である非共有結合 (疎水性相互作用・イオン結合・水素結合等) により、多様な高次構造を有する。圧力処理によってタンパク質の高次構造の変化 (タンパク質変性) が誘起されるため状態が変化する。また、微生物への圧力印加も行われており、酵母や芽胞をもたない細菌は 5000 気圧の処理で細胞膜が破壊され、殺菌される。さらに HIV 等のエンベロップを持つウイルスは 6000 気圧の処理でほぼ完全に不活化される¹⁵⁾。このように 6000 気圧を超える超高压状態ではほぼ全ての生物が死滅し、圧力技術の殺菌効果が注目されている。

4.3 超高压脱細胞化生体組織の生体内埋植

清潔下にて摘出したミニブタ心臓より肺動脈弁を採取し、低温下にて 10000 気圧の超高压印加処理 (4℃, 10 分間) を行い、続いて洗浄処理したところ、組織深部まで完全に細胞を除去することができた。EVG 染色したところ、超高压処理後においても弁葉内のコラーゲン線維やエラスチン線維が保存されていることが認められた。力学特性を検討したところ、超高压処理において力学特性への影響が見られなかった。

脱細胞化生体組織の再生医療用足場材料としての機能を検討するために脱細胞したミニブタ大動脈を同所性にミニブタの下行大動脈に移植し、左心系大血管での有効性について検討した。いずれの個体も経過は良好で、死亡例はなかった。摘出組織像を図 4 に示す。移植 1 ヶ月後に試料を摘出したところ、血栓の付着はほとんど見られず、血管内面は内皮細胞様の細胞で覆われてい

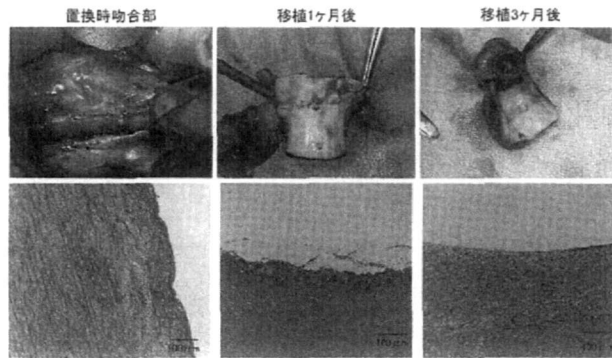


図 4

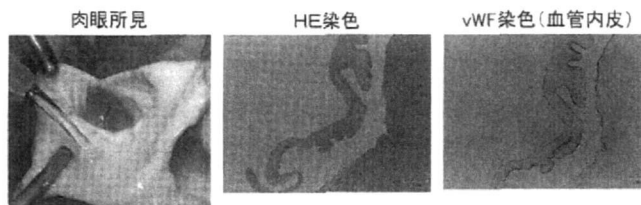


図 5 脱細胞化ブタ肺動脈弁の同所性移植実験 (6ヶ月後)

ることがわかった。移植3ヶ月後では、血栓は全く観察されず、また内面は内皮細胞と思われる細胞によって完全に被覆されており、肉眼的にも内皮特有の光沢面が観察された。脱細胞化血管においては、おそらく血液内に存在する血管内皮前駆細胞もしくは骨髄細胞が脱細胞化血管内面に局在化し、血管壁と相互作用することによって分化が進行して、血管組織を再構築したのではないかと考えている。この仮説が成立するのであれば、脱細胞化組織は未成熟の細胞を選別し、局所で分化を完成させることによって組織再生を行うような、高い機能を有していることとなり、単純な足場以上の効果を発現する高機能材料としての展開も期待できる。

また、肺動脈系(静脈系)においては血管再生について高い再現性と長期にわたる(6ヶ月以上)良好な開存が得られており(図5)、臨床応用も視野に入れた研究を行っている。一方、大動脈系(動脈系)においては、3ヶ月までは良好な再生が得られるが、6ヶ月を過ぎる頃から、石灰化や内膜肥厚が観察される場合が生じてくる。これらの原因として、血管組織を構成するタンパク質の変性、細胞成分の残存などが考えられる。これらを解決するために、超高压処理法の詳細な条件設定、血管壁からのエラスチン(弾性タンパク質)の除去、洗浄液の検討、および残存細胞膜成分(脂質)の除去等の検討を行った結果、大動脈組織における石灰化等の問題もほぼ解決し、現在、長期埋植動物実験を継続している。

4.4 超高压脱細胞

超高压水圧印加の組織を用いて、気管、心膜、皮膚らのうち、超高压角膜移植は円錐日本では、提供角か移植術を受ける発展途上国の方もある。この解と膜再生技術^{17,18)}後の脱落や感染¹⁹⁾膜再生では、温生が臨床応用さ: 実質においてはる脱細胞化組織性について検討

成体ブタ眼²⁰⁾ SDS 溶液を調整の超高压印加処方法で得られた脱細胞化ブタ角界面活性剤²¹⁾織内の細胞の²²⁾では、組織内の移植すると、8た(図7)。一²³⁾間経過後も、²⁴⁾細胞化角膜は、²⁵⁾反応の惹起を²⁶⁾より、脱細胞

4.4 超高压脱細胞化法の角膜組織への応用

超静水圧印加法による細胞除去技術の他の組織への応用について検討した。ミニブタの種々の組織を用いて、それぞれの組織からの脱細胞化について検討した。対象とした組織は、心筋、気管、心膜、皮膚、軟骨、骨、靭帯、腱などの組織と、肺、肝、腎、脾などの臓器である。これらのうち、超高压処理法の特徴が顕著であった脱細胞化組織として、角膜を取り上げて紹介する。

角膜移植は円錐角膜や角膜の外傷などの角膜疾患において有効な治療法の一つである。しかし日本では、提供角膜が不足により、年間5,000人いると言われている移植適応患者のうち1/3しか移植術を受けることができないのが現状である。また、角膜移植が必要な患者は先進国よりも発展途上国の方が多く、全世界での角膜移植適応患者数は100万人に達するとのWHOの報告もある。この解決策として、高分子材料を用いた人工角膜の開発¹⁶⁾および再生医療技術による角膜再生技術^{17,18)}が検討されている。高分子製人工角膜は米国に於いて実用化されているが、移植後の脱落や感染等の問題があり、長期間有効なものはまだ存在しないのが現状である。一方、角膜再生では、温度応答性培養皿、羊膜、及びコラーゲン膜を用いた細胞シートによる角膜上皮再生が臨床応用されつつあり、その有用性が示されている。しかし、これら細胞の足場となる角膜実質においては、臨床に応用できるものはまだない。そこで、生体に類似した物性と構造を有する脱細胞化組織に着目し、種々の手法による脱細胞化角膜の作製と眼科用足場材料としての可能性について検討した。

成体ブタ眼球から角膜を採取し、界面活性剤による脱細胞化法は1% TritonX-100およびSDS溶液を調製し、37℃にて24時間処理を行った。超高压処理方法は、10℃にて10000気圧の超高压印加処理を10分間行った後、振盪洗浄を72時間行い、細胞残渣を除去した。これらの方法で得られた脱細胞化角膜組織に対して組織学・生化学的評価を行ない、超高压処理角膜では脱細胞化ブタ角膜組織のウサギへの異種組織移植の動物実験も行った。

界面活性剤処理では、いずれの場合においても不透明な角膜が得られ、H-E染色において組織内の細胞の残存が確認された(図6)。超高压処理でも、白濁した角膜が得られたがH-E染色では、組織内の細胞は完全に除去されていた。ウサギ眼への移植実験では、未処理のブタ角膜を移植すると、8週間後には移植片部位に多数の新生血管が観察され、免疫反応の惹起が認められた(図7)。一方、脱細胞化ブタ角膜移植では、移植2週間後で移植片は完全に透明化した。8週間経過後も、透明性は維持されており、新生血管の誘導は観察されなかった。これらのことより脱細胞化角膜は、生体角膜に類似した構造を有しており、かつ、組織内細胞の完全除去により免疫反応の惹起を抑制することが可能であった。また、移植組織の透明性の回復が観察された。以上より、脱細胞化角膜の眼科用足場材料としての可能性が示唆された。

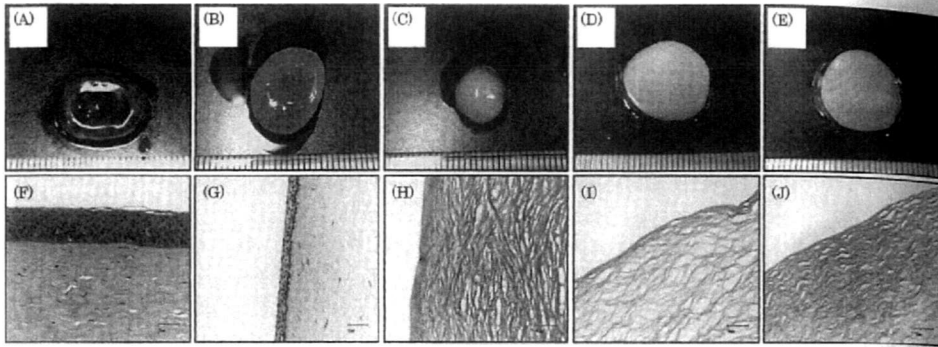


図6 種々の脱細胞化角膜の肉眼所見と組織切片像

(A), (F) 未処理 / (B), (G) TritonX 100による脱細胞化角膜 / (C), (H) SDSによる脱細胞化角膜 / (D), (I) 超
 高压処理による脱細胞化角膜 (30°C) / (E), (J) 超高压処理による脱細胞化角膜 (10°C)。Scale bar 50 μm。

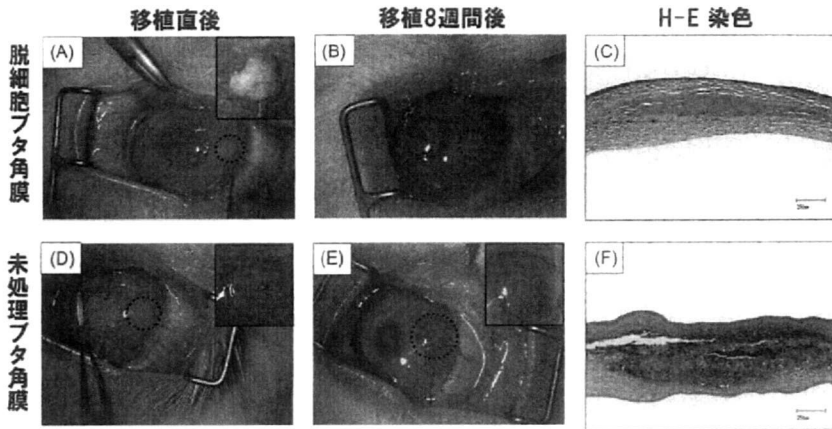


図7 脱細胞化ブタ角膜のウサギ眼移植実験の経時変化

5 将来展望

未だ長期間に渡って満足できる性能を発揮する人工臓器や組織は開発されておらず、また、患者の成長に伴って人工臓器に成長性を与えることはほとんど不可能である。再生医療は、皮膚、角膜、心臓弁など比較的簡単な構造機能型の「組織」から応用が開始され、今後は、脳、肝臓、心臓、膵臓など複雑な機能を有する「臓器」へと発展していくことが期待されている。これを実現するためには、足場材料、細胞、成長因子、バイオリクターに加えて、任意の細胞を足場材料の任意の位置に配置できるような新しい技術が必要である。今後も再生医療の発展には、医学、生物学、工学、薬学の研究の融合が必要である。本稿がその一助になれば幸いである。

謝辞
 共同研究者のフ
 ンター心臓血管
 及び北村惣一郎
 一小林尚俊グ
 ー広尾病院)に感
 に感謝します。

- 1) Langer R
- 2) Lanza R, Academi
- 3) Asahara Schatten
- 4) Mizuno : 327
- 5) Ingham
- 6) Furuzon K, Tan: 217-226
- 7) Cryolife
- 8) Lifecell
- 9) Autotiss
- 10) 日本人 (suppl)
- 11) Elkins KS, Cl adaptiv
- 12) Teebke dovase
- 13) Koross
- 14) Dohme 74 (5),
- 15) 鈴木敦
- 16) Additi (http:
- 17) Nishid Kikucl 1196 (
- 18) Koizui 1569-

謝辞

共同研究者の大阪工業大学藤里俊哉教授に感謝いたします。心臓弁・血管の研究について国立循環器病センター心臓血管外科沼田智医師、庭屋和夫医師、臓器移植部中谷武嗣部長、研究所生体工学部山岡哲二郎長及び北村惣一郎名誉総長に感謝します。また、角膜の研究については、物質・材料研究機構生体材料センター小林尚俊グループディレクター、東京医科歯科大学眼科学教室望月学教授、佐々木修司医師（現東京都立広尾病院）に感謝します。所属研究室の木村剛助教、南広祐特任助教ならびに協力していただいた学生諸氏に感謝します。

文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP, Tissue Engineering, *Science*, **260**, 920-926 (1993)
- 2) Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds., Principles of Tissue Engineering Third Edition, Academic Press 2007, San Diego
- 3) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM, *Science*, **275**, 964-966 (1997)
- 4) Mizuno S, Tateishi T, Ushida T, Glowacki J, *J Cellular Physiol*, **200**, **194** (3), 319-327
- 5) Ingham E, Fisher J, *Eur Cell Mater*, **6** (suppl 2) 5 (2003)
- 6) Furuzono T, Wang PL, Korematsu A, Miyazaki K, Oido-Mori M, Kowashi Y, Ohura K, Tanaka J, Kishida A, *J Biomed Mater Res, Part B, Appl Biomater*, **200**, **65B** (2), 217-226
- 7) Cryolife 社ホームページ (<http://www.cryolife.com/products/synergraft-technologies>)
- 8) Lifecell 社ホームページ (<http://www.lifecell.com/products/95/>)
- 9) Autotissue 社ホームページ (http://www.autotissue.de/herstellung_en.html)
- 10) 日本人工臓器学会レジストリー委員会, 人工臓器のレジストリー 2000, 人工臓器, **30** (suppl) (2001)
- 11) Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, Black KS, Clarke DR, O'Brien MF., Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Oct; **13** (4 Suppl 1): 87-92
- 12) Teebken OE, Puschmann C, Aper T, Haverich A, Mertsching H., *Eur J Vasc Endovasc Surg.*, Apr; **25** (4), 305-12 (2003)
- 13) Korossis SA, Fisher J, Ingham E., *Biomed Mater Eng*, **10** (2), 83-124 (2000)
- 14) Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF, *Ann Thorac Surg.*, Nov; **74** (5), 1438-42 (2002)
- 15) 鈴木敦士, 林力丸編, 高圧生物学と高圧技術 1997, さんえい出版, 京都
- 16) Addition Technology 社のホームページ (<http://www.alphaacor-ati.com/AlphaCor/AlphaCor.html>)
- 17) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y, *New Engl J Med*, **351**, 1187-1196 (2004)
- 18) Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S, *Ophthalmology*, **108** (9), 1569-1574 (2001)

また、患
皮膚、
肝臓、
これを実
を足場材
は、医学、

In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas

Shuji Sasaki,^{1,2,4} Seiichi Funamoto,^{3,4,5} Yoshihide Hashimoto,^{3,4,6} Tsuyoshi Kimura,^{3,4} Takako Honda,^{4,7} Shinya Hattori,^{4,7} Hisatoshi Kobayashi,⁴ Akio Kishida,^{3,4,5} Manabu Mochizuki¹

¹Department of Ophthalmology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ²Department of Ophthalmology, Tokyo Metropolitan Hiroo Hospital, Tokyo, Japan; ³Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ⁴Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan; ⁵JST-CREST, Saitama, Japan; ⁶Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo, Japan; ⁷Japan Health Sciences Foundation, Tokyo, Japan

Purpose: To evaluate the stability and biocompatibility of artificial corneal stroma that was prepared by using ultrahigh hydrostatic pressurization treatment to decellularize corneas.

Methods: The porcine cornea was decellularized by two methods, a detergent method and an ultrahigh hydrostatic pressure (UHP) method. Either 1% w/v Triton® X-100 or sodium dodecyl sulfate (SDS) was used for the detergent method, and 10,000 atmospheres (atm; 7.6×10^6 mmHg) was applied to the cornea for 10 min at 10 °C by a high-pressure machine for the UHP method. Hematoxylin-eosin staining was performed to confirm the removal of the corneal cells, and then decellularized porcine corneal stroma was implanted into rabbit corneal pockets. After eight weeks, the rabbit eyes were enucleated to examine the tissue compatibility of the implanted stroma.

Results: Complete decellularization was confirmed only in corneas treated by the UHP method, and little inflammation was seen when they were implanted into the rabbit corneal pockets.

Conclusions: Porcine corneal stroma completely decellularized by the UHP method has extremely high biocompatibility and is a possible corneal scaffold for an artificial cornea.

Injury or corneal diseases can lead to corneal opacification for which currently the only effective therapy is corneal transplantation [1]. Conditions such as corneal dystrophy, bullous keratopathy, and corneal scarring are treated by replacing the defective cornea with a clear donor cornea. Since the first human corneal transplant in 1905, corneal transplantation has been one of the most successful forms of tissue transplantation [2]. However, complications such as infection, immune rejection, and graft failure are possible, and allograft reaction has been reported to be seen in 31% of penetration keratoplasty patients. Furthermore, there is a worldwide shortage of donor corneas, due in part to many donated corneas not being able to be used because of infection.

One way to overcome these difficulties is to develop artificial corneas [3], and among the various synthetic polymers investigated for this purpose are poly(methyl methacrylate) [4], poly(2-hydroxyethyl methacrylate) [5], and poly(vinyl alcohol) [6]. Alphacor™ was the first synthetic artificial cornea available commercially [7-9], but no artificial cornea has been fully successful yet. Their failure to be

accepted by recipient tissue and to be invaded by the recipient's corneal cells results in their extrusion through melting around the prosthetic rim [10] or other adverse effects such as protein adsorption, rejection with down-growth, and infection.

The engineering of cornea tissue has recently been presented as a promising solution to the limited corneal replacement with allografts. Pellegrini et al. [11] reported that the ocular surface can be reconstituted using epithelial cells cultured in vitro on a contact lens. Furthermore, Minami et al. [12] attempted to reconstitute a cornea (including the epithelium, stroma, and endothelium) in vitro by using a collagen gel culture system under an air-liquid interface. Orwin et al. [13] reported that corneal tissue could also be reconstituted in vivo by combining corneal cells and a collagen sponge. While these reports indicate the feasibility of corneal regeneration using corneal cells and collagen scaffolds, the structure and mechanical properties of their collagen gel and sponge were inadequate for an artificial cornea that can be used clinically. The mechanical properties and structure of the scaffold for corneal reconstruction must be similar to those of the natural cornea. The ideal scaffold for corneal tissue engineering would allow epithelization, endothelialization, and repopulation with autologous interstitial cells.

Correspondence to: Professor Hisatoshi Kobayashi, Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki, 305-0044, Japan; Phone: +81-29-860-4495; FAX: +81-29-860-4715; email: kobayashi.hisatoshi@nims.go.jp

One strategy for preparing a scaffold is the use of decellularized tissue in which the donor cells and antigen molecules are completely removed to diminish the host immune reaction. Some groups have attempted to use porcine cornea for xenografting because it would be available in amounts sufficient to meet clinical demand [14]. Many decellularizing methods for preparing acellular tissues have been reported, and most use detergents to remove cells from tissues. Acellular tissues of the vessel, heart valve, dermis, and ligament have been successfully prepared by using Triton® X-100 [15,16], sodium dodecyl sulfate (SDS) [17,18], sodium deoxycholate [19,20], and polyethylene glycol [21] to remove the donor cells and their components. However, detergents are generally toxic and need to be washed out. Sometime, detergent treatment and the following wash-out process may lead to the denaturation of the tissue and destroy their structures.

For ideal xenografting, the cellular immune reaction should be decreased by removing donor cells from the cornea, but the corneal superstructure should be maintained to keep the cornea transparent. In general, the transparency of the cornea is explained by a lattice theory of the corneal materials in which the corneal superstructure is an optically clear lattice of regularly aligned collagen fibrils. Thus, the ideal decellularization process would be one that removes all the cell components without destroying the corneal superstructure.

Several methods have been reported to be effective for decellularizing corneas [22-26], and decellularizing corneal tissues have been shown to be biocompatible. However, their mechanical characteristics still need to be improved. We recently developed a novel physical process that uses ultrahigh hydrostatic pressure (UHP) technology to decellularize tissue without using detergents [27] (Figure 1), and in the work reported here, we compared its use with that of a detergent method in the decellularization of porcine cornea. Using decellularized porcine cornea, an implantation experiment into the rabbit eye was performed to see if we could apply the decellularized porcine cornea for xenografting as an artificial cornea.

METHODS

Materials: Porcine eyes were purchased from Shibaura Zoki Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Japanese white rabbits were purchased from Kitayama Labes Co., Ltd. (Nagano, Japan). Dextran (molecular weight=70,000 g/mol) was purchased from Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan). SDS was purchased from Wako Co., Ltd. (Osaka, Japan). Triton® X-100 was purchased from Sigma-Aldrich Co., Ltd (Tokyo, Japan). Phosphate buffer saline (PBS) was purchased from Invitrogen Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Endothelial growth medium (EGM-2) was purchased from Sanko Junyaku Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

Preparation of porcine cornea: The entire cornea was removed from the eye, washed with PBS containing penicillin (100 units/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml), and stored at 4 °C in PBS containing these antibiotics and dextran (3.5% w/v) until the experiments were performed.

Chemical decellularization: Corneas were immersed in a 1% w/v solution of either Triton® X-100 or SDS at 37 °C for 24 h, washed with PBS containing penicillin (100 units/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml) for another 24 h, and then subjected to hematoxylin-eosin (H-E) staining for histological study.

UHP decellularization: Corneas were pressurized at 10,000 atm for 10 min at 10 °C by using a high-pressure machine (Kobe Steel, Ltd., Kobe, Japan), washed under air containing 5% CO₂ by continuous shaking for 72 h at 37 °C in an EGM-2 medium containing DNase I (0.2 mg/ml), antibiotics, and 3.5% w/v dextran, and then subjected to hematoxylin-eosin (H-E) staining for histological study before they were used for transplantation.

Histological study: Native and decellularized corneas (five of each) were fixed for 24 h in a 10% neutral buffered formalin solution at room temperature. They were then cut, stained with H-E, and observed with an optical microscope.

Measurement of residual DNA content: After 20 mg of each freeze-dried decellularized cornea was digested at 55 °C for 12 h in 0.5 ml of a tissue lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl, 50 µg/ml proteinase K, 1% w/v SDS, 100 mM NaCl, and 20 mM disodium EDTA, the DNA content was calculated from the difference in the absorbance at 260 nm measured

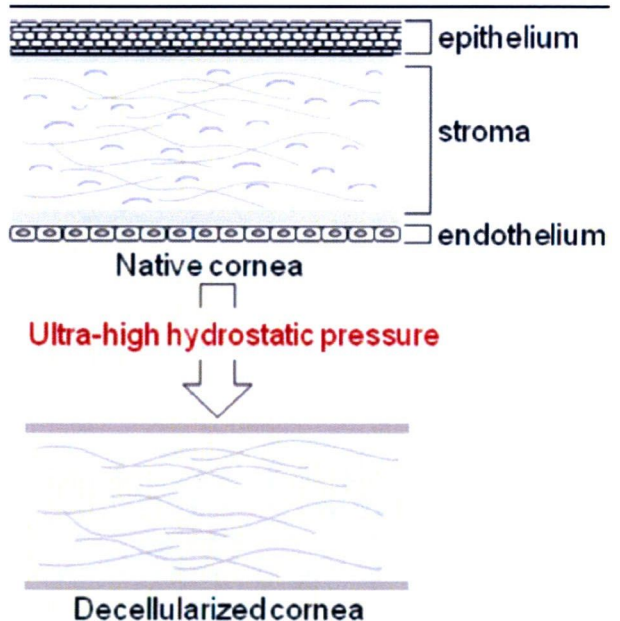


Figure 1. Concept of decellularization using ultrahigh hydrostatic pressure. Ultrahigh hydrostatic pressure (UHP) treatment removes all the cells of the native cornea (epithelial cells, keratocytes, and endothelial cells).

before and after extracting DNA with phenol and chloroform and precipitating it with ethanol. Five corneas were used for each group.

Measurement of residual GAG content: Glycosaminoglycans (GAGs) or mucopolysaccharides such as hyaluronic acid and chondroitin sulfate help maintain the structure of connective tissues, so a decreased GAG content would indicate destruction of tissue structure. We therefore used an Alcian blue assay to measure the residual GAG in the tissue. After 20 mg of each freeze-dried decellularized cornea was digested at 65 °C for 24 h in a papain solution (100 mM sodium acetate buffer, 0.5 mg/ml papain, 0.5 mM disodium EDTA), Alcian blue was added and a microplate reader was used to measure the absorbance at 600 nm. The GAG was calculated from the absorbance by using chondroitin sulfate standard solutions. Five corneas were used for each group.

Statistical analysis: Measurements of residual DNA and GAG content were performed three times. Mean±SD values were calculated. Data were analyzed statistically by Student's *t*-test. A $p < 0.05$ was regarded as significant.

Preparation of decellularized porcine cornea: After physiologic saline was injected into the vitreous humor of a porcine eyeball to raise the intraocular pressure, a microkeratome was used to prepare a corneal flap 160 µm thick. The corneal flap was treated with ultrahigh hydrostatic pressure three days before the transplantation, and it was stored in an EGM-2 medium at 4 °C until transplantation. Corneal discs 2 mm in diameter were prepared with a corneal punch.

Transplantation of decellularized porcine cornea into rabbit corneal stroma: Decellularized porcine cornea was transplanted into the left eye of Japanese white rabbits (female, 3 kg and 12 weeks old) according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research. All animal experiments were approved by the ethical committees for animal welfare of Tokyo Medical and Dental University (Tokyo, Japan) and National Institutes for Materials Science (Tsukuba, Japan). The corneas of the recipient animals ($n=11$) anesthetized with intravenous Nembutal™ (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japan) and topical Xylocaine™ (AstraZeneca, Osaka, Japan) were incised with a surgical knife to about half the depth of the corneal stroma, tangent to the pupil at four positions 90° apart around the edge of the pupil (3, 6, 9, and 12 o'clock). Stromal pockets were then formed by inserting a spatula into each incision, directing the inserted edge of the spatula toward the corneal limbus, and using it to separate the stromal layers. A decellularized porcine corneal disc was put into three of the pockets, and a non-decellularized one was put into the other pocket as a positive control (Figure 2). Eight weeks after the transplantation, the left eye was enucleated and the cornea was stained with hematoxylin and eosin for histological study.

RESULTS

Decellularization: After a porcine cornea was immersed in a 1% w/v solution of Triton® X-100 for 24 h and then washed with PBS for 24 h, it was cloudy and more than five times thicker (Figure 3C) than it was before treatment (Figure 3A). Comparing an H-E stained section of the native cornea (Figure 3B) with that of a cornea treated with Triton® X-100 (Figure 3D), one sees loosening of the collagen fibrils in the corneal stroma and shrinkage of the epithelial layer in the treated cornea and also that few cells of the cornea were removed by the treatment. The cornea treated with SDS (Figure 3E) was not swollen as much as the one treated with Triton® X-100 (Figure 3C), but it was smaller, its surface was melted, and its interior was extremely cloudy because the nuclear materials of the disrupted cells remained (Figure 3F). Thinning of the epithelial layer and disordering of the superstructure of collagen fibrils in the stroma were also observed in the corneas treated with the detergents.

Although the porcine cornea treated with UHP was also extremely cloudy and slightly swollen after washing in an EGM-2 medium (Figure 3G), H-E staining showed the absence of cells in the epithelium and stroma and the maintenance of the superstructure of collagen fibrils in the stroma (Figure 3H). These results indicate that the UHP method is useful for decellularizing the porcine cornea without destroying its structure.

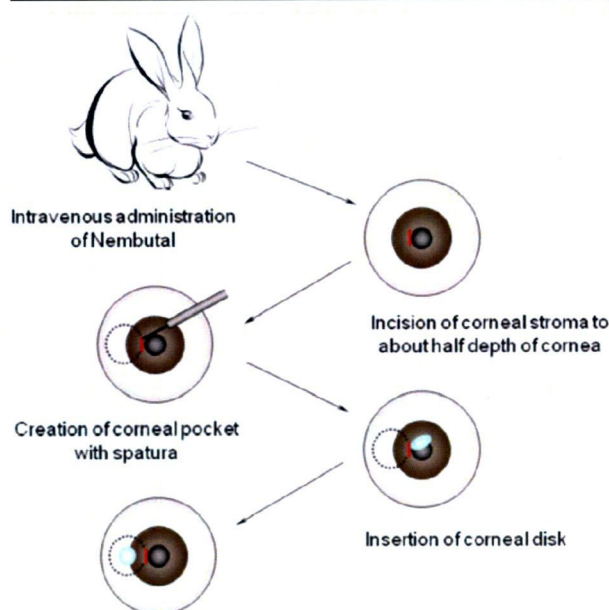


Figure 2. Procedure of transplantation of decellularized porcine corneal disc into a rabbit corneal pocket. The recipient rabbit is anesthetized with intravenous Nembutal and topical Xylocaine, a corneal pocket is made with a spatula, and a decellularized or native porcine corneal disc is inserted into the corneal pocket.

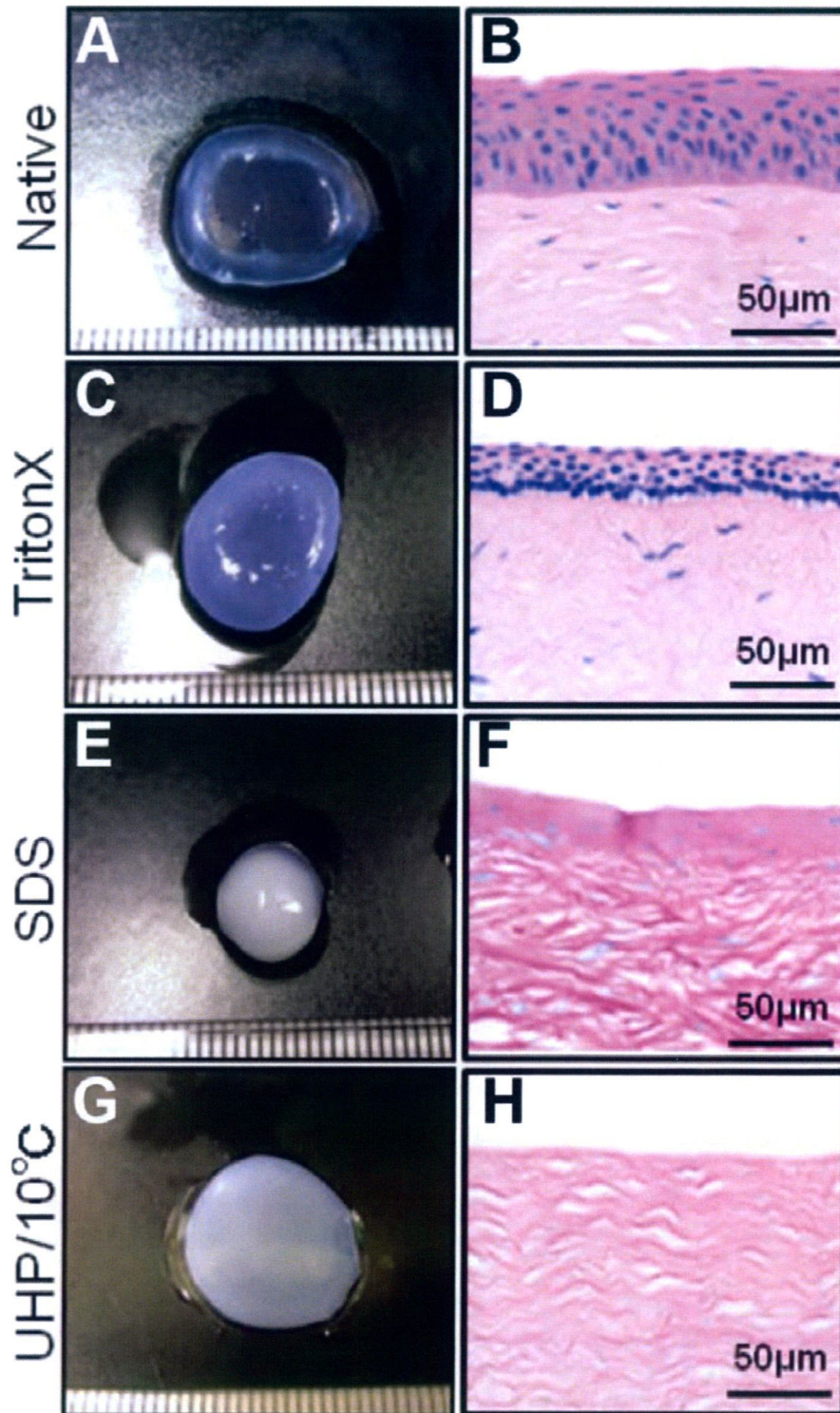


Figure 3. Representative photographs and H-E stained sections of the porcine corneas decellularized by various methods. The left column shows photograph of native cornea (A), cornea treated with Triton® X-100 (C), cornea treated with SDS (E) and cornea decellularized by UHP (G). The right column shows H&E stained section of native cornea (B), cornea treated with Triton® X-100 (D), cornea treated with SDS (F) and cornea decellularized by UHP (H). Epithelial cells and keratocytes are seen in the corneas treated with Triton® X-100 or SDS but not in the cornea treated with UHP. Scale bar, 50 µm.

TABLE 1. CONFIRMATION OF DECELLULARIZATION.

Sample	DNA content mean±SD (µg/mg dry wt)	GAG content mean±SD (µg/mg dry wt)
Native cornea	3.46±0.18	223.0±19.1
Triton® X-100	2.32±0.28*	169.9±8.33*
SDS	1.16±0.21*	38.6±3.01*
UHP/10 °C	0.12±0.02*	201.3±10.1

The DNA and GAG content of the corneas decellularized by various methods were measured. These results indicate that only the corneas treated with UHP lost cells without losing GAG-collagen interactions. Data are expressed as the mean±SD; n=5 in each group. The asterisk indicates a p<0.05.

Confirmation of decellularization: The DNA content of the corneal tissues treated with Triton® X-100 and SDS were 2.32±0.28 and 1.16±0.21 µg/mg, respectively. They were significantly lower than the DNA concentration of the native cornea (3.46±0.18 µg/mg) but much greater than zero. On the other hand, the DNA concentration of the porcine corneal tissues treated with UHP is almost zero (0.12±0.02 µg/mg), which indicates complete removal of cell components from the corneal tissue. (Table 1)

GAG content: The GAG content of the corneal tissues treated with Triton® X-100 and SDS were 169.9±8.33 and 38.6±3.01 µg/mg, respectively, significantly lower than the GAG content of native cornea (223.0±19.1 µg/mg), indicating that the structure of the connective tissues is not maintained in detergent-treated corneas. The GAG content of the corneal tissues treated with UHP, on the other hand, is almost the same as that of native cornea, which means the connective tissue structure was not destroyed by the UHP treatment. (Table 1)

Transplantation of decellularized porcine cornea into rabbit corneal stroma: To evaluate the possibility of using porcine corneas decellularized by the UHP method as a substitute for corneal stroma, we implanted them in corneal stromal pockets in rabbits and implanted native porcine corneas as positive controls. The native implanted corneal discs were fairly clear just after the operation (Figure 4D), but one week later, blood vessels were seen in them and they began to become cloudy (data not shown). The native donor tissue was extremely cloudy four weeks after implantation, and eight weeks after implantation, many vessels were observed around it, indicating the occurrence of an immune reaction (Figure 4E). The histological section showed the infiltration of neutrophils and macrophages in and around the donor tissue and also showed the formation of a cell layer (Figure 4F). On the other hand, in the decellularized cornea group, the donor tissue appeared very cloudy just after implantation (Figure 4A) but began to become transparent one week later (data not shown). Two weeks later, the donor tissue in the decellularized cornea group was completely transparent and could not be recognized without a microscope. The transparency was kept until eight weeks after the implantation, and no vessels were observed (Figure 4B). The histological section showed minimal

inflammation around the donor tissue, which indicated that no immune rejection occurred (Figure 4C).

DISCUSSION

In this study, we compared two methods of tissue decellularization and demonstrated the extremely high biocompatibility of porcine corneal discs decellularized by the UHP method.

Corneal decellularization was performed by chemical and physical methods. Triton® X-100 and SDS, which have often been used in decellularization protocols [28], were used for chemical decellularization. These detergents caused the corneas to swell and become irreversibly cloudy. They did not become transparent again even when they were treated with glycerol (data not shown). The obvious decrease of GAG content also indicates the disruption of the corneal superstructure. These results suggest that the superstructure of the cornea was strongly denatured by Triton® X-100 and SDS. The UHP method, on the other hand, removed all corneal cells. Although corneas treated with UHP were extremely cloudy just after they were treated, they became transparent again when treated with glycerol (data not shown). The glycerol treatment dehydrated the UHP-treated cornea, playing the role normally played by the Na⁺-K⁺ pump of the endothelial cells. The results of the histological study and the measurement of GAG content also indicate the maintenance of the corneal superstructure. The swelling seems to be caused not by the disruption of corneal superstructure but by the lack of the pumping function of the endothelial cells.

In the transplantation study, only native corneas and corneas decellularized by the UHP method were used. Triton® X-100 and SDS did not remove all the cells from the corneas. It was obvious that corneas with residual cells would cause a severe immune reaction to the recipients like native corneas. Moreover, SDS decreased the mechanical strength of the corneas so much that they could not be inserted into stromal pockets. Therefore, we used native corneas and corneas decellularized by the UHP method from the viewpoint of animal protection.

The transplantation of decellularized porcine corneas into rabbit corneal pockets induced little immune reaction whereas

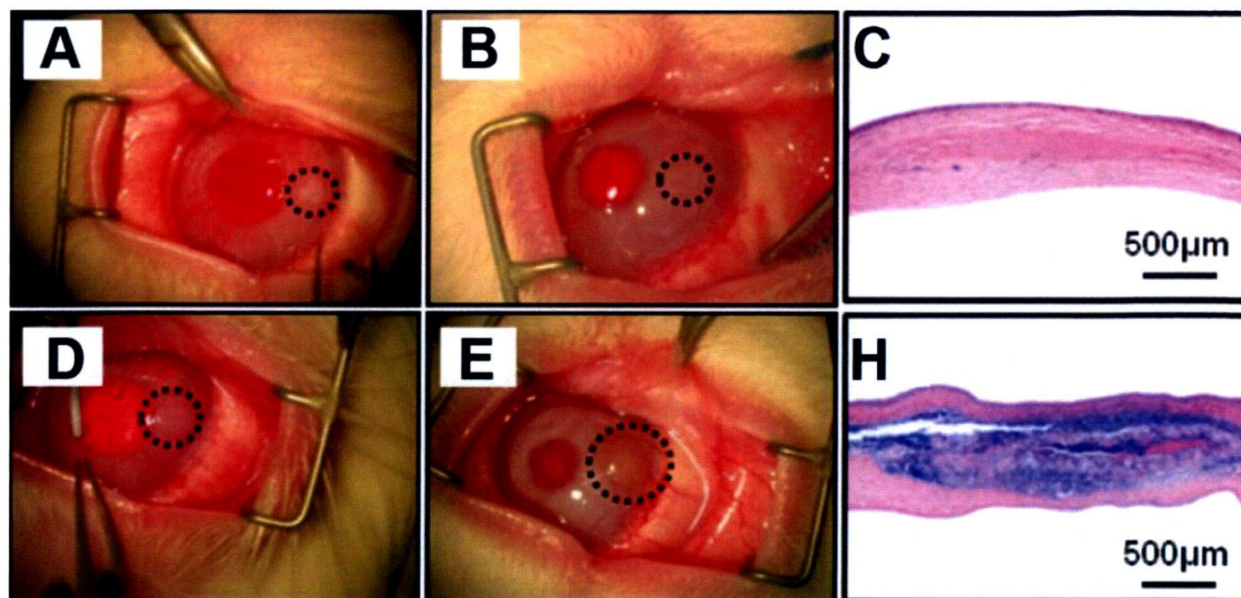


Figure 4. Representative photographs and H-E stained sections of transplanted porcine corneal discs. The left column shows photograph of decellularized (A) and native (D) porcine corneal disc just after transplantation into rabbit corneal pockets. The middle column shows photograph of decellularized (B) and native (E) porcine corneal disc eight weeks after transplantation. The right column shows H&E stained section of decellularized (C) and native (F) porcine corneal disc eight weeks after transplantation. Decellularized corneal discs caused slight inflammation and recovered transparency whereas native corneal discs caused severe immune reactions and remained cloudy. Scale bar, 500 μ m.

native corneas caused severe inflammation. This decellularization method involves two processes, disruption of the cells, bacteria, and viruses by ultrahigh pressurization [29,30] and removal of the residues of cellular components by washing in a culture medium. We previously reported the successful decellularization of porcine heart valve and trachea by this method [27]. In the transplantation experiment, the decellularization process removed all the corneal cell components including bacteria and viruses. The native cornea tissue may have been rejected not only of xenografting but also because of infectious pathogens. Although many countries are running short of donated corneas, some are rejected because of infection. The UHP method may reproduce unusable corneas from infected corneas by removing the pathogens.

In conclusion, we have developed a corneal decellularization method using UHP technology. The decellularized corneal tissue did not cause immunological rejection in a xenograft transplantation model. These results indicate that decellularized cornea stroma that was prepared using UHP technology is a possible scaffold for an artificial cornea.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Translational Research, and Research on Health Sciences focusing on Drug Innovation from the Ministry of Health, Labour and Welfare, and by the Special Coordination Funds for Promoting Science

and Technology from the Japan Science and Technology Agency. Professor Kobayashi and Kishida contributed equally to the research project and can be considered co-corresponding authors.

REFERENCES

- George AJ, Larkin DF. Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am J Transplant* 2004; 4:678-85. [PMID: 15084160]
- Moffatt SL, Cartwright VA, Stumpf TH. Centennial review of corneal transplantation. *Clin Experiment Ophthalmol* 2005; 33:642-57. [PMID: 16402960]
- Chirila TV, Chirila M, Ikada Y, Eguchi H, Shiota H. A historical review of artificial cornea research. *Jpn J Ophthalmol* 2005; 49:S1-13. [PMID: 15717417]
- Dudenhoefer EJ, Nouri M, Gipson IK, Baratz KH, Tisdale AS, Dryja TP, Abad JC, Dohlman CH. Histopathology of explanted collar button keratoprotheses: A clinicopathologic correlation. *Cornea* 2003; 22:424-8. [PMID: 12827047]
- Chirila TV. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials* 2001; 22:3311-7. [PMID: 11700803]
- Shimmura S, Miyashita H, Uchino Y, Taguchi T, Kobayashi H, Shimazaki J, Tanaka J, Tsubota K. Microkeratome-assisted deep lamellar keratoprosthesis (DLKPro). *Br J Ophthalmol* 2006; 90:826-9. [PMID: 16597665]
- Chirila TV, Hicks CR, Dalton PD, Vijayasekaran S, Lou X, Hong Y, Clayton AB, Ziegelaar BW, Fitton JH, Platten S, Crawford GJ, Constable IJ. Artificial cornea. *Prog Polym Sci* 1998; 23:447-73.