

Reduction of Antigenicity and Risk of Infection in Regenerative Tissue Transplantation by Cold Isostatic Pressing

Toshia Fujisato^{*1}, Kazuo Niwaya², Kenji Minatoya², Akio Kishida³, Takeshi Nakatani³, and Soichiro Kitamura⁴

¹Regenerative Medicine & Tissue Engineering, ²Cardiovascular Surgery, ³Organ Transplantation

⁴National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

⁵Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kandasugugadai, Chiyoda, Tokyo 101-0062, Japan

*E-mail: fujisato@ri.ncvc.go.jp

Received 4 December 2006/Accepted 11 December 2006

Abstract

Tissue engineered heart valves based on acellular tissue have been studied to have more durability and bio-functionality with growth potential and less immunogenicity. Whereas they have still several problems to be solved such as complete cell removal and transfer of unknown animal related infectious diseases. In this paper, our novel tissue processing for decellularization using ultrahigh pressure for the safe tissue transplantation was reported. Porcine cardiac tissues were isolated and treated by a cold isostatic pressing for a disruption of donor cells. The cell debris was then washed out by washing solution at 4°C. The tissues treated were completely cell free when they were applied to 980 MPa for 10 min. There was no porcine endogenous retrovirus detected. There were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. The acellular grafts of pulmonary valve were transplanted to allogeneic miniature pigs. The explanted grafts showed remarkable cell infiltration and endothelialization. This processing may provide more durable and safe scaffold for the regenerative tissue transplantation.

Keywords: tissue engineering, tissue transplantation, acellular, scaffold

1. Introduction

The implantable cardiovascular medical devices have been clinically used for more than 30 years as substitution for the patient's deficient tissues. The artificial heart valve is one of the most clinically used medical devices applied to about 300,000 patients per year worldwide. There are two kinds of artificial heart valves currently used. A xenograft heart valve is made of the chemically crosslinked porcine valve or bovine pericardium to reduce antigenicity of the xenogeneic tissue. A mechanical heart valve is made of pyrolytic carbon or titanium. The former has good biocompatibility, hemodynamics, and resistant to infections compared with the latter. However, the durability of the xenograft valve is relatively short especially in pediatric patients for about 5-10 years by the calcification of the glutaraldehyde-fixed animal tissue. Recent establishment of the human tissue bank has made it easy to use allogeneic tissues for the transplantation that are superior to the current artificial devices. However, since they are donated from the cadavers, the supply is very limited and some donated tissues may not be applicable due to infection. In addition to the above issues, all the devices and tissues lack the growth potential and they may be replaced repeatedly through the patients' growth process.

All of the current medical devices remain as foreign bodies even after the implantation. If a device accepts host cell impregnation and is replaced by the host tissue after the implantation,

it may acquire perfect biocompatibility and growth ability. An ideal candidate for such a regenerative scaffold is a decellularized allogeneic or xenogeneic tissue since it does not require tissue fixation for removal of antigenicity. Detergents and/or enzymes such as Triton® X-100, sodium dodecyl sulphate, deoxycholate, trypsin, DNase, and RNase have been commonly used for the cell removal media from the tissue [1-4]. However, the decellularization depends on their permeation in the tissue and may not be achieved completely in large or hard tissues. And furthermore, since the detergents are generally cytotoxic and it takes time for their removal, it may lead denature of biological properties and contamination in the process. Recent BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) and vCJD (variant Creutzfeldt-Jakob disease) issues have been affecting to the tissue transplantation from the point of view of safety. In this paper, a cold isostatic pressing (CIP) was applied for removal of the cells and inactivation of viruses in the cardiovascular tissues to have scaffold for the safe regenerative tissue transplantation.

2. Material and methods

The porcine heart valves were isolated from 4 month-old Clawn miniature pigs (Japan Farm Co. Ltd, Kagoshima, Japan) weighing about 10 kg under the sterile condition. The harvested tissues were packed immediately in sterile bags filled with phosphate buffered saline (PBS) and treated by ultrahigh pressure of 980 MPa for 10 min using a CIP apparatus (Dr. Chef, Kobe Steel Ltd, Kobe, Japan) for cell demolition (Fig. 1). The range of temperature in the process is about 5 to 30°C. They were then rinsed by PBS for 2 weeks under gentle stirring at 4°C for removal of the residues of the broken cells. They were subjected to the histological observation by the light and electron microscopy, DNA and phospholipids assay, detection of porcine endogeneous retrovirus (PERV) by the PCR, and biomechanical study by the tensile strength measurement.

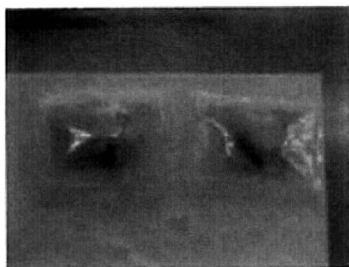


Fig. 1 Packed porcine heart valves for CIP treatment.

The acellular tissues were transplanted orthotopically into nine allogeneic miniature pigs. The pulmonary valves were transplanted at right ventricular outflow tract through a median sternotomy with extracorporeal circulation without blood oxygenation [5]. The postoperative anticoagulation or anti-platelet therapy was not instigated. They were explanted 4, 12, and 24 weeks (n=3) after the transplantation and examined histologically and immunohistologically. All animals were carefully reared in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institute of Health (NIH publication No.85-23, revised in 1985).

3. Results and discussion

The tissues were completely cell free when they were treated by the CIP for 10 min followed by washing for 2 weeks from the H-E staining (Fig. 2). The amount of DNA and phospholipids were lower than 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.5 mg/wet g, respectively and those were less than 10% in the native tissue (Fig. 3).

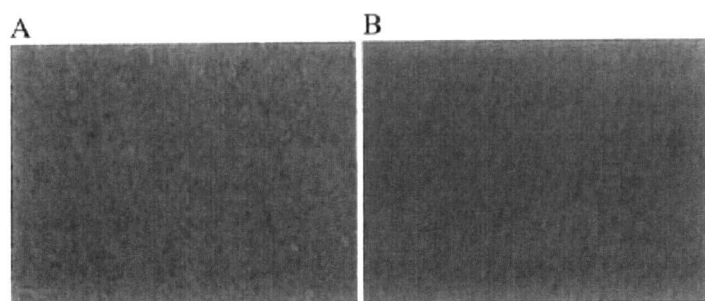


Fig. 2 Cross sections of (A) native and (B) treated tissues (H-E staining).

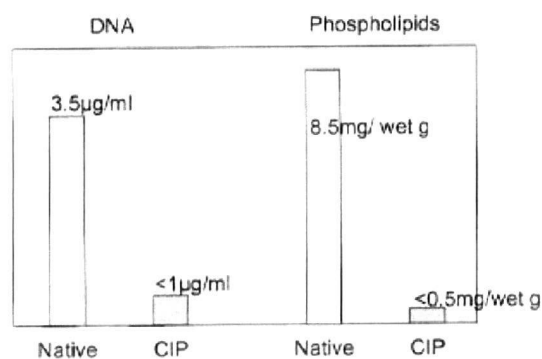


Fig. 3 Residual amounts of DNA and phospholipids in native and treated tissues.

The collagen and elastin fibers were well maintained in the acellular tissue and there were no significant changes in biomechanical properties of the breaking strength and elastic modulus. We have already found that this process could be successfully applied to cartilage tissues for decellularization (not shown). More effectively, it has been reported that the most of viruses including HIV are inactivated by the CIP only of more than 600 MPa without washing [6]. This means the treatment is able to sterilize the tissue in addition to the decellularization. The Clawed miniature pig was chosen as a donor animal since its size adapts human tissues well and its genome has been well studied in order to develop a human gene induced transgenic animal for the organ transplantation. There was no PERV detected in PCR assay from the tissue treated (Fig. 4).

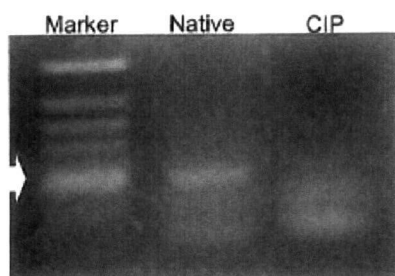


Fig. 4 PCR products of PERV (arrow) in native and treated tissues.

The animals survived after the transplantation in the all cases. The explanted grafts showed no macroscopical abnormality and no dilatation and aneurysmal changes including their anastomosis. The inner surface was completely covered with endothelial cells and the inside was infiltrated by cells from both sides of endothelium and outer tissue after 12 weeks. It was dominant in the latter. Almost of the tissue including cusps were filled by the cells at 24 weeks, mainly by smooth muscle cells (Fig. 5). There was no inflammation and calcification observed in the tissue.

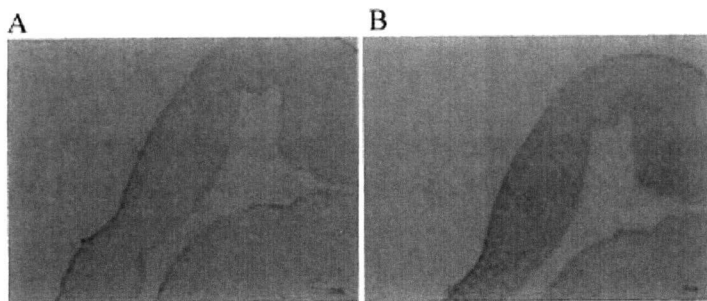


Fig. 5 Cross sections of (A) anti-vWF (endothelial cells) and (B) anti- α SMA (smooth muscle cells) immunostained treated tissues 24 weeks after the transplantation.

Recently, some groups have reported excellent clinical results of acellular pulmonary heart valve transplantation [7-9]. We are planning a clinical application of the acellular grafts made by this process in the near future.

4. Conclusion

Porcine cells and PERV were removed completely by the CIP treatment without using any detergents. The acellular grafts showed remarkable ability in repopulation after the transplantation. This CIP treatment may have more secure acellular graft for the regenerative tissue transplantation.

5. Acknowledgement

This study was supported by the Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

6. References

- [1] Bader, A., Schilling, T., Teebken, O.E., Brandes, G., Herden, T., Steinhoff, G., and Haverich, A. (1998) Tissue engineering of heart valves - human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur. J. Cardiothorac Surg.* 14 (3), 279-284.
- [2] O'Brien, M.F., Goldstein, S., Walsh, S., Black, K.S., Elkins, R., and Clarke, D. (1999) The SynerGraft valve: a new acellular (nongluteraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 11 (4 Suppl 1), 194-200.
- [3] Steinhoff, G., Stock, U., Karim, N., Mertsching, H., Timke, A., Meliss, R.R., Pethig, K., Haverich, A., and Bader, A. (2000) Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 102 (19 Suppl 3), III50-55.
- [4] Booth, C., Korossis, S.A., Wilcox, H.E., Watterson, K.G., Kearney, J.N., Fisher, J., and Ingham, E. (2002) Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J. Heart Valve Dis.* 11 (4), 457-462.

- [5] Numata, S., Fujisato, T., Niwaya, K., Ishibashi, U.H., Nakatani, T., and Kitamura, S. (2004) Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: Comparison with cryopreserved Allograft. *J. Heart Valve Dis.* 13, 984-990.
- [6] Hatashi, R. (2002) High pressure in bioscience and biotechnology: pure science encompassed in pursuit of value. *Biochem Biophys Acta* 1595, 397-399.
- [7] Tavakkol, Z., Gelehrter, S., Goldberg, C.S., Bove, E.L., Devancy, E.J., and Ohye, R.G. (2005) Superior durability of SynerGraft pulmonary allografts compared with standard cryopreserved allografts. *Ann. Thorac. Surg.* 80 (5), 1610-1614.
- [8] Cebotari, S., Lichtenberg, A., Tudorache, I., Hilfiker, A., Mertsching, H., Leyh, R., Breymann, T., Kallenbach, K., Maniuc, L., Batrinac, A., Repin, O., Maliga, O., Ciubotaru, A., and Haverich, A. (2006) Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* 114 (1 Suppl), 1132-137.
- [9] Erdbrugger, W., Konertz, W., Dohmen, P.M., Posner, S., Ellerbrok, H., Brodde, O.E., Robenek, H., Modersohn, D., Pruss, A., Holinski, S., Stein-Konertz, M., and Pauli, G. (2006) Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. *Tissue Eng.* 12 (8), 2059-2068.

繊維と線維(生体線維の洗浄と再生医療への展開)

Textile Fiber and Medical Fiber

澤田和也・寺田堂彦・藤里俊哉

1. はじめに

衣料用繊維素材は、植物や動物等の天然由来のものから、ナイロンやポリエステル等に代表される人工的なものまで、その種類が極めて多岐に渡っている。製造・加工技術の著しい進歩により、高機能化された繊維製品も多く登場し、我々の衣生活スタイルも大きく変化してきた。近年、繊維製品は工業・産業資材等にも広く応用化されていることは周知の通りであるが、それでも“繊維＝衣料品”のイメージが強いことには変わりない。ここでは視点を少し変え、一般に殆ど認識されていない動物由来繊維の一種を紹介したい。動物由来繊維として連想できるものは、獣毛や絹糸等の体外で採取される蛋白質繊維であろう。しかし実際には、体内にも同様の線維が存在している。ここで、“繊維”と“線維”の単語を使い分けたが、その差に大きな意味はない。慣例的に、衣料分野では“繊維”が、医療分野では“線維”が用いられている。英語に訳せば何れも fiber であり、「細くて長いもの」という定義で本質的に同じである。さて、体内に存在する線維として、最も理解し易い例として血管を挙げる事が出来る。実際、繊維状の生体適合性高分子材料を用い、人工血管を造形することも多い。図1に血管の概略図を示した。血管組織を大雑把に見ると、遺伝情報を含む生物体の構成単位である細胞、それを支持して

いる細胞外マトリックスから成る。さらに、細胞外マトリックスは、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞接着性蛋白質と、コラーゲン及びエラスチンを主とする線維性蛋白質から構成されている。従って、血管組織から細胞や接着因子を除去すれば、最終的にはコラーゲン線維およびエラスチン線維が残ることになる。上述した生体内の線維とは、これらを意味しており、体の部位により組成は異なるが、脊椎動物の身体の構造要素の主体である。ここで紹介させて頂く線維のテーマは、これら生体内線維を再生医療で応用化しようとする研究例である。

2. 研究背景

我々の体内に疾患組織が生じた場合、その回復を図る手段として最も望ましいことは、自己治癒により組織そのものを治癒化させることである。しかし、欠損もしくは機能不全に陥った組織に対しては、代替物との置換、つまり“移植”という手段も適応される。筆者らの研究チームが対象とする組織は心臓弁であるが、これについても同様である。現在、心臓弁置換の代替物には、バイロライト製の機械弁を用いるのが主である。最近では、一生の使用に耐え得る強度を有する製品も開発されている。しかし、これらの機械弁にも多くの問題が含まれている。例えば、生涯にわたる抗血栓剤の服用は、安全性や経済面において問題が残る。

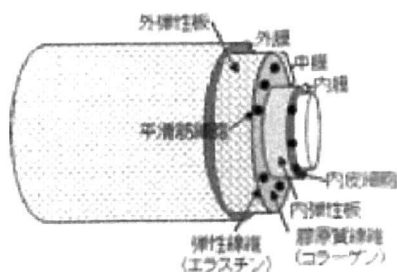


図1 血管構造の概略図



DOHIKO TERADA

大阪工業大学 工学部 博士研究員

博士(工学)

〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1

〈専門〉高分子材料加工

〈趣味〉読書



KAZUYA SAWADA

大阪成蹊短期大学 総合生活学科
准教授 博士(工学)
〒533-0007 大阪市東淀川区相川3-10-62

Tel: 06-6829-2561 Fax: 06-6829-2579

E-mail: sawada-k@osaka-seikei.ac.jp
〈専門〉繊維加工、染色化学、コロイド化学

〈趣味〉スキー、旅行



TOSHIYA FUJISATO

大阪工業大学 工学部 教授 工学博士

〒535-8585 大阪市旭区大宮5丁目16-1

Tel: 06-6954-4746

E-mail: fujisato@bme.oit.ac.jp

〈専門〉再生医工学、組織工学

〈趣味〉旅行計画

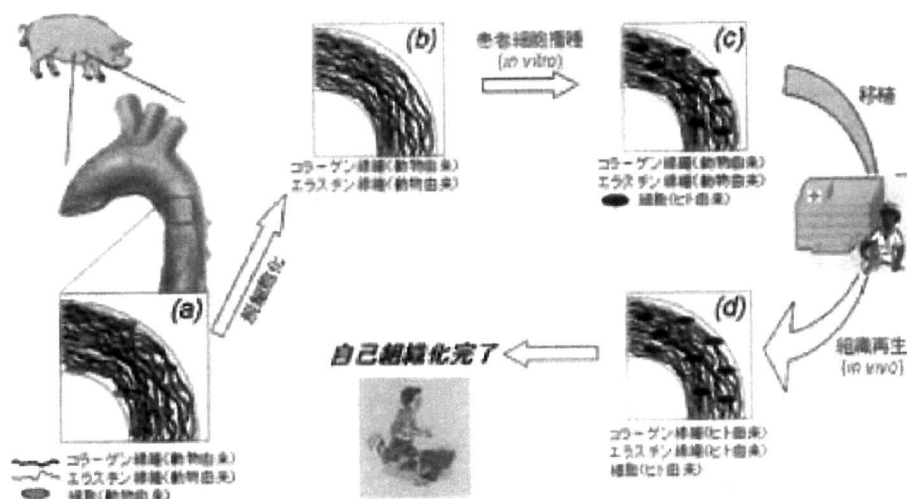


図2 下行大動脈をモデルとした生体線維による再生医療

また、サイズが永久に不変なため、小児患者では成長と共に再手術が避けられない。一方、ヒトから提供される心臓弁であれば、機能面では好都合である。しかし、ドナーの絶対的な不足は今後も解消の見込みが無い。そこで近年、置換代替物として動物由来の心臓弁を利用するという、両者の中間に位置する検討が進められている。図2は、それらの概念図であり、簡略のため心臓弁ではなく下行大動脈をモデルとして示した(a)。欠損した組織を医療用動物由来のものと置換するが、その際に動物由来細胞を除去(脱細胞)し、移植の足場となる線維組織のみの構造体(スキャフォールド)を作成する(b)。次に、患者から採取した細胞を生体外にてスキャフォールドへ播種・培養させる(c)。この際、細胞のスキャフォールドに対する親和性・接着性を高めるため、必要に応じスキャフォールドに対し表面加工を行う。この過程においては繊維表面加工の技術が活かされている。その後、外科的にスキャフォールドの移植を行うが、患者自身の細胞を含む組織であるので、拒絶反応は大幅に低減される。一方、スキャフォールドである線維組織そのものは、異種由来であることから、移植後長年をかけて徐々に分解され、代わりにヒト由来の線維組織が再生する(d)。最終的には患者自身の組織で置換され自己組織化が完了する。

織化が完了する。

この概念では、血管はもちろん、心臓弁や気管など多くの組織に適応可能なことから応用性が高い。さらに、極めて複雑な構造の生体組織を造形する必要が無い。一方、異種由来組織を用いる場合、前記のように免疫反応を無くすためにドナー由来細胞を除去し、線維組織のみにすることが必須となる。換言すれば、摘出組織から細胞という不純物を洗浄除去することになる。興味深いことに、この操作は、衣類の洗浄と同様、界面活性剤による洗浄が一般的である。本稿では血管組織を例として、洗浄により細胞を洗い流し、スキャフォールドを得るための手段について、筆者らの研究成果も交えて紹介する。

3. 生体線維の洗浄手法

— 界面活性剤/酵素併用による洗浄法 —

この手法は、現在最も一般的に行われる手法であり、図3にその概略を示した。界面活性剤水溶液による洗浄効果を高めるため、ビルダーとして酵素を添加する場合もあり、衣料の洗浄と原理は全く同じである。ただ、使用される界面活性剤はSDSやTritonX-100が主であり、最適洗浄効果を考えた界面活性剤のスクリーニングは皆無に近い。また、

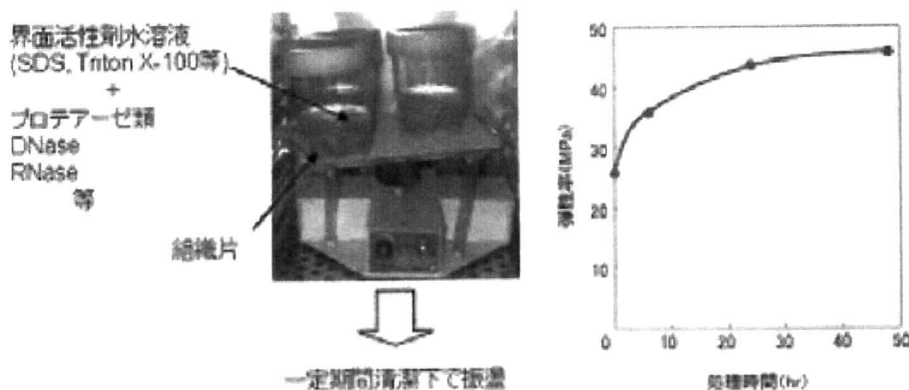


図3 界面活性剤による脱細胞化 (左: 洗浄手法 右: 処理前後の力学特性変化)

酵素には線維組織を加水分解し、細胞を除去し易くするため、プロテアーゼを用いることもある。しかし、これら実際にはトリプシンやキモトリプシンの利用が通例であり、それ以上の工夫は殆どない。衣料洗浄と異なる点は、DNAやRNAの分解を目的として、DNaseやRNaseを添加するケースがあることである。この様な洗浄により、組織中の細胞が洗い流され、最終的にコラーゲン線維やエラスチン線維のみが維持される。この手法では、一連の操作に要する時間がおよそ数日間とされる。これは、界面活性剤除去(すすぎ洗い)のための十分な時間も必要なためであり、この点においては衣料の洗浄と大きく異なる。しかしながら、十分な「すすぎ洗い」をしたとしても、線維に吸着した界面活性剤の全量を除去することは困難である。さらに、これらの界面活性剤は何れも細胞毒性を示すことから、僅かな組織内残存も好ましくない。また、同図右に示すように、界面活性剤処理により線維組織の力学特性が変化することも知られている。さらに、強度維持のためアルデヒドを用いた架橋処理が施されるのが通例であるが、生体吸収性の低下や後述する石灰化との関連が指摘されている。これらを総合的に考えると、同法による脱細胞化では、強度や毒性などの生体への安全性問題が残されていると結論せざるを得ない。現在、これらの欠点を補うため、電離活性線照射の併用等、種々の工夫も試みられている。

次に紹介する例は、これに替わる新たな手法として著者らの研究チームが開発している例である。

4. 超高静水圧印加法

界面活性剤による洗浄は、細胞を洗い流すという観点において大変優れた手法である。しかし、線維組織の硬化や、界面活性剤の残存が大きな問題である。そこで、その欠点を克服する手段として、超高静水圧印加処理を考案した。これは、試料に対しおよそ10000気圧を等方的に10分間印加し、その後緩衝溶液下で洗浄するものである(図4上段)。この操作では、超高圧印加により細胞が破壊され、その後の水溶液洗浄で容易に細胞除去が可能になる。化学薬剤を用いない物理的手法であり、毒性面における生体へ

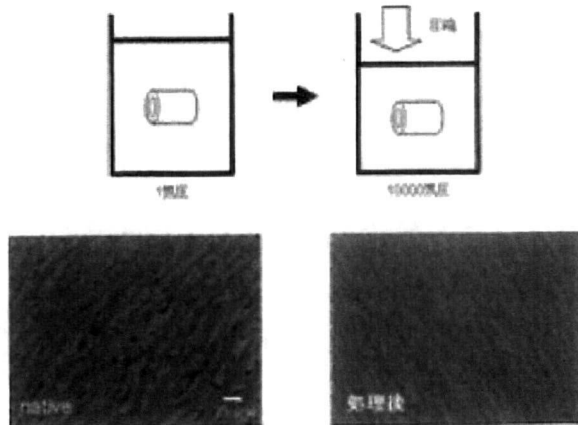


図4 超高圧印加処理と脱細胞化評価

の安全性が極めて高い。図4下段は同法で洗浄を行った結果であり、Hematoxylin-Eosin (HE)染色を行った写真である。尚、本稿における組織染色写真は、全て血管の断面部である。同写真左において native の血管では粒状に細胞が染色されているのに対し、処理後の写真では染色されておらず、効果的に脱細胞が行われている。また、コラーゲンやエラスチンの線維組織はそのまま維持されていることもわかる。又、内在性レトロウィルス (PERV) の残存も PCR法で評価を行ったが、それらが不活化されたことも確認している。次に、除去が困難とされる細胞膜リン脂質の残存を評価した結果を図5に示した。リン脂質は、移植後の石灰化の要因の一つとして問題視される物質であり、細胞除去の際に併せて評価すべき要因の一つである。図5上段の定量分析結果によると、超高圧印加処理のみではリン脂質が除去されていない。下段のTEM観察結果も同様の結果を示している。濃い黒に写っている部分がリン脂質であり、細胞膜及び核膜部分に集中している。本法は界面活性剤を用いない点で優れているが、逆に疎水性の高いリン脂質を単純に除去しにくいことも示している。しかし、この問題は比較的容易に解決可能であり、施圧後にアルコール浸漬することにより除去可能になる。同図の定量分析結果からも明らかな様に、殆どのリン脂質がアルコール処理により除去されている。しかし、極めて僅かな残存も確認される。TEM観察の結果では、核膜に起因するリン脂質の一部が残存している。極めて僅かな残存が生体にどのような影響を与えるかについては現段階では不明であるが、現在大動物を用いた長期移植経過観察中であり、今後の検討項目になるであろう。

5. 超臨界流体抽出法

超高圧印加法は、物理的手法であり界面活性剤処理やアルデヒド処理を含む工程に比べ、高い安全性が確保できる有効な手段である。しかし、リン脂質除去のために多段階工程が必要なこと、そして長期間(約3週間)の処理が必要という点で問題が残る。そこで、これらを改善する手法として研究を進めているのが、超臨界流体抽出法である。超

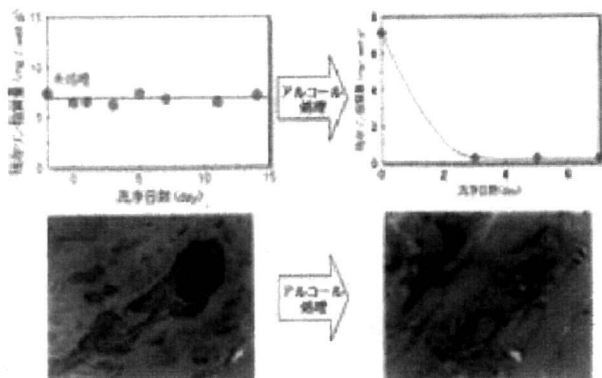


図5 脱細胞処理血管のリン脂質量変化 (上段: 定量分析結果 下段: TEM観察結果)

臨界流体抽出は、既に製薬・食品分野で広く実用化されており、今も新たな応用化分野が広がっている。超臨界流体の最大の特徴は、圧力制御により媒体の誘電率を連続的に変化させることが可能な点である。つまり、単一媒体にもかかわらず、圧力変化のみで複数の溶媒特性を引き出すことが可能になる。誘電率変化の程度は媒体により異なるが、適切な媒体選択により複数の目的物質を選択的に抽出することが可能になる。現在、抽出において最も実用化例の多い媒体はCO₂である。本研究チームにおいてもCO₂を媒体の有力候補として検討している。超臨界CO₂の脱細胞化への利用における利点は幾つかある。その一つは、高い安全性である。脱細胞処理後、大気圧下に戻すことにより、CO₂は自然拡散し、組織内に残存することは無い。従って、毒性等の生体への危険性は無視出来る。もちろん、CO₂以外にも気体又は揮発性の高い液体を用いた場合でも同様である。また、CO₂に限っては臨界条件が温和なため、蛋白質が変性し難い条件で処理可能である。さらに、処理後の組織は、半乾燥または絶乾状態で得られ、長期保存が可能になる。次に、超臨界流体の持つ高い拡散性は、液体に比べ組織深部への浸透をはるかに容易にする。従って、溶液洗浄に比べ処理時間を著しく短縮出来る可能性を有する。以上より、同法での細胞抽出が可能であれば、従来法を凌駕する優れた脱細胞化手法と成り得る。

図6は、実際に超臨界CO₂を用いて処理を行った組織の処理前後のHE染色結果を示している。同図が示すように、CO₂単独では如何なる圧力領域でも効果的な細胞抽出は出来ていない。CO₂の場合、圧力変化に伴う誘電率変化の割合は比較的小さいことから、極性の高い細胞成分を溶解抽出することが困難なようである。しかしながら、極性を上げるためのエントレーナを少量添加した場合、抽出効果の大きな改善が見られる。エントレーナの存在により、混合流体は細胞抽出可能な溶媒特性へと変化している。持筆すべきは処理時間の短縮であり、この写真は15分処理の効果を示している。脱細胞効果を得るため、超高圧印加法では3週間、界面活性剤溶液洗浄でも数日間という期間を要したが、本法での15分間という時間は画期的な短縮である。一方、リン脂質の除去については完全除去には至っていないが、ある程度高い効果が得られることを確認している。現在、単一工程での完全除去を達成するための検討を進めている。

ここで紹介した結果は、CO₂とエントレーナの系であるが、現在他の媒体を単独を用いた場合の効果も検討している。今後、動物実験へ向けての最適媒体及び処理条件の決

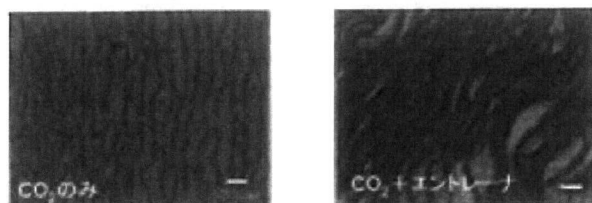


図6 超臨界二酸化炭素処理血管のHE染色比較

定が待たれる。

6. 防石灰化手段と血管の形態安定加工

ここまでは、脱細胞化手段についての紹介を行った。脱細胞化は、移植後急性の免疫反応を抑制することと密接に関連している。一方、実際の症例においては、移植後長期での移植組織の石灰化問題が存在する。残念ながら、石灰化の明確な機序については、現在も不明である。しかし、様々な要因が報告されており、その一つが上述の細胞膜リン脂質の残存である。他方、線維組織であるエラスチンの変性に起因するという報告も多い。本研究チームでも以前よりその機序について詳細な検討を重ねて来た。その結果、それらの単一要因ではなく、複合されて石灰化に繋がるという考えを持っている。従って、石灰化を誘引する可能性全てを消去することが、結果的に問題解決の近道であると考えている。そこで、脱細胞とは別要因である、エラスチン線維の変性に着目した検討結果を合わせて紹介する。

本研究手法を含め、組織に対し人為的(化学的又は物理的)処理を行えば、不可逆的にそれらの立体構造にミクロな歪みが生じる。我々も、機器分析により線維の立体構造に変性が生じることを確認している。エラスチン線維の変性を指摘する研究者は、このミクロな変性を挙げている。実際、石灰化部位はエラスチン線維に沿って生じる例が多い。ここで、同じ線維組織であるコラーゲンの変性が、石灰化と無関係とは断言出来ない。しかし、興味深いことに、実際の症例ではコラーゲン線維に沿った石灰化は殆ど見られない。さて、線維組織の変性であるが、現実問題として多少の変性無くして人為的処理を施すことは不可能である。そこで、単純な発想であるが、要因であるエラスチン線維を除去しコラーゲン線維のみの構造体にすれば、石灰化を抑制出来るかも知れない。

図7は、コラーゲン線維とエラスチン線維を区別するため、血管組織にElastica van Gieson(EVG)染色を行った例を示している。左図で濃く染色された線維がエラスチン、薄く写っている線維がコラーゲンである。エラスチン線維はコラーゲン線維と異なり、弾性に富み著しい伸張性を有する。その結果、常にストレスのかかる生体組織を柔軟に変形させ、耐久性を維持している。既に、エラスチン線維のみを選択的に除去する技術は幾つか報告されている。しかし、単純にそれを行うと別の問題が生じる。図8中央はエラスチンを除去した血管組織を示しているが、弾性の無くなった組織は、その構造が維持できない程度に変形する。

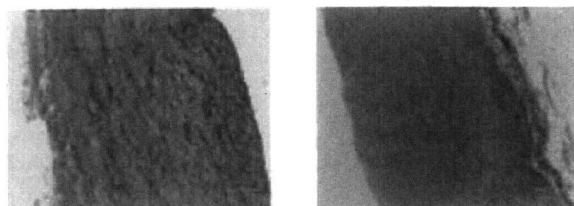
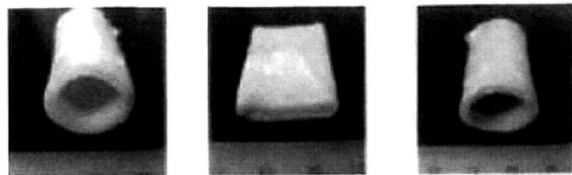


図7 血管組織のEVG染色写真
(左：native組織 右：エラスチン除去組織)



コラーゲン線維 エラスチン線維 コラーゲン線維のみ コラーゲン線維のみ

図8 線維組織と形状変化
(左: native 中: エラスチン除去
右: 形態安定加工+エラスチン除去)

もちろん、力学強度測定を行うと、それが著しく低下する。そこで、コラーゲン線維のみでも形態を維持することが出来るよう、組織に対し形態安定加工を施す。衣類の形態安定加工は古くから行われているが、同様のことを生体組織に行うわけである。医用応用であること、および生体吸収性を考慮すれば、用いる薬剤や手法に工夫が必要であるが、原理は衣用と同じである。図7右の写真は、エラスチン線維が除去された血管のEVG染色結果である。同図左の写真と比較し、エラスチン線維が染色されていない。一方、残されたコラーゲン線維はそのまま維持されており、エラスチン線維のみが分解除去されている。また、図8右の写真は形態安定加工が施されたコラーゲン線維からなる血管である。コラーゲン線維のみであるにもかかわらず、血管の立体構造が維持されている。このコラーゲン線維血管の力学強度を評価した結果、破断強度に関しては native のそれと大差がないことも確認された。この様に、エラスチン線維を除去し、かつ力学強度を維持した構造体を形成することが出来た。そこで、この組織の石灰化抑制効果の評価するため、一定期間ラットの皮下へ組織を移植し、評価を行った。図9は、皮下移植した組織を12週間後に取り出し、石灰化評価のための von Kossa 染色を行った結果を示している。左写真は、native 血管をそのまま皮下移植した場合であり、明らかな石灰化が認められる。それに対し、右写真が示すように、エラスチン線維を除去した血管では

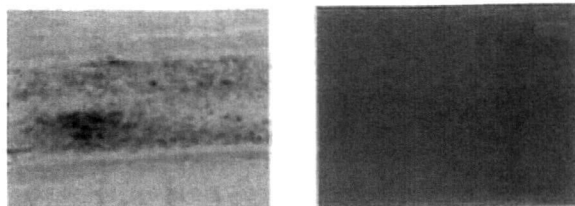


図9 ラットの皮下へ移植した血管組織の von Kossa 染色写真(12週)
(左: native 組織 右: 脱エラスチン組織)

石灰化が認められない。同様に行った他の組織の一部で軽度の石灰化が認められた例もあるが、native に比べ明らかな有効性が確かめられた。上記のように、石灰化は複数の要因が重なることで生じると考えられ、今後さらに夫々の要因を詳細に評価していくことが必要となる。

7. おわりに

生体内の線維と衣料用の繊維は全く異なるものと考えるのが通常であろう。実際、コラーゲン線維やエラスチン線維を、衣料用品に応用するという発想はない。“細くて長い”という表現で共通しているだけかも知れないが、実際に病理で評価される組織染色と繊維の染色は同じ原理である。また、本稿で述べた洗浄や加工についても、原理は何れも共通である。素材が共通していれば、結果的に加工技術の原理も共通するに至って当然かも知れない。しかし、全く内容の異なる分野でそれぞれ独自に開発されてきた技術が、結果的に基本原理が共通であったという点で筆者は興味深さを覚えている。本稿で紹介した内容については、欧米では既に臨床治験に入っている例もある。極めて優れた繊維科学の技術を有する我が国において、両分野の技術融合を加速させれば、技術開発の大きな飛躍に繋がるのではないだろうか。“医療の繊維”と“衣料の繊維”、語呂合わせのように見えるかも知れないが、その根底概念が共通していることを最後に強調したい。

第21回キチン・キトサンシンポジウム

主催：日本キチン・キトサン学会
共催：日本化学会、日本生化学会、日本生物工学会
協賛：(社)繊維学会ほか
日時：平成19年7月26日(木)～27日(金)
場所：神戸国際会議場(神戸市中央区港島中町6-9-1)
<http://www.keva.or.jp/kcc/icck/>
詳細は、下記にお問い合わせ下さい。
〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31
産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門バイオ
ベースポリマーグループ(相羽誠一)
TEL: 072-751-9522 FAX: 072-751-9628
E-mail: chitin@m.aist.go.jp <http://www.jscc.jp/>

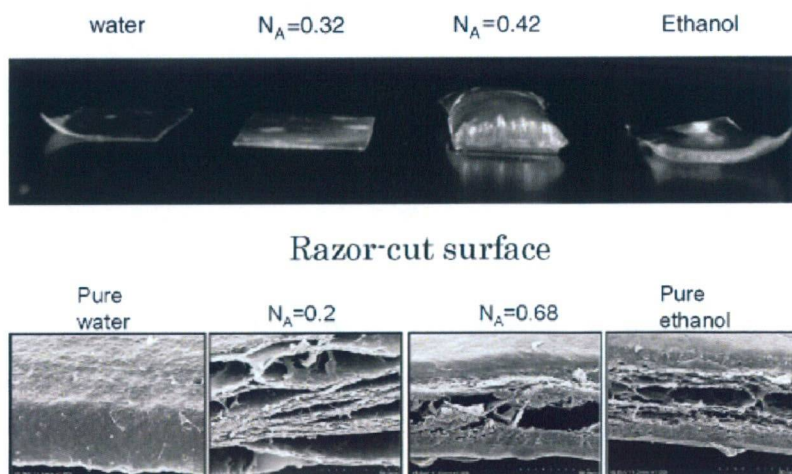
第55回レオロジー討論会

主催：日本レオロジー学会、日本バイオレオロジー学会
共催：金沢大学、日本材料学会、プラスチック成形加工学会
協賛：(社)繊維学会ほか
日時：平成19年11月1日(木)～3日(土)
場所：金沢大学角間キャンパス南地区 自然科学本館
(〒920-1192 金沢市角間町)
<http://www.kanazawa-u.ac.jp/university/access/images/kakumal.pdf>
講演申込締切：平成19年8月10日(金)
要旨集原稿提出締切：平成19年10月1日(日)
詳細は、下記にお問い合わせ下さい。
〒600-8815 京都市下京区中堂寺栗田町93番地
京都リサーチパーク内 (社)日本レオロジー学会
TEL: 075-315-8687 FAX: 075-315-8688
E-mail: member@srj.or.jp

Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents

Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida*

To control the crosslinking rate of the collagen gel, ethanol/water co-solvent was adopted for the reaction solvent for the collagen microfibril crosslinking. Collagen gel was prepared by using EDC and NHS as coupling agents. Ethanol did not denature the helical structure of the collagen and prevented the hydrolysis of EDC, but showed the protonation of carboxylate anions. In order to control the intra- and interhelical crosslink of the collagen triple helix, variations of the mole ratio of carboxyl group/EDC/NHS, and of the ethanol mole concentration were investigated. Increase in the EDC ratio against the carboxyl group increased the crosslinking rate. Furthermore, an increase in the ethanol mole concentration resulted in an increase of the crosslinking rate until ethanol mole concentration was 0.12, but showed gradual decrease as the ethanol mole concentration was further increased. 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. The re-crosslinking of the collagen gel showed an increase in the crosslinking rate, but did not show further increase when the coupling reaction was executed for the third time. This implied that the highest possible crosslinking rate for the intra- and interhelical is approximately 60% when EDC/NHS is used.



K. Nam, T. Kimura, A. Kishida
Division of Biofunctional Molecules, Institute of Biomaterials and
Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10
Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan
Fax: 03-5280-8029; E-mail: kishida.fm@tmd.ac.jp

Introduction

The construction of an extracellular matrix (ECM) using natural products has been performed by many researchers worldwide. Based on the fact that an ECM is mainly composed of collagen and elastin, many researchers have

attempted to prepare a collagen- or elastin-based material to construct an ECM. Ever since Weinberg and Bell succeeded in preparing a blood vessel using collagen,^[1] diverse approaches using collagen gel to prepare an ECM had been executed. 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 crosslinkers to overcome these problems was investigated and is well reviewed by Khor.^[2] By crosslinking 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 crosslinking process because of the possibilities of severe problems such as toxicity, inflammatory response or the alteration of protein structure.

A crosslinking method using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS) in aqueous condition is a one of the best methods to produce a non-toxic collagen product. This reaction mixture induces the formation of an amide bond by activation of the side chain carboxylic acid groups of aspartic and glutamic acid residues, followed by aminolysis of the *o*-isoacylurea intermediates by the ϵ -amino groups of (hydroxy-)lysine residues, forming intra- and interhelical crosslinks.^[3–5] A coupling reaction that involves EDC depends on the amount of EDC and on the EDC/NHS ratio.^[4–6] A higher EDC and NHS mole ratio against the carboxylic groups increases the coupling reaction rate. The pH of the solvent for the coupling reaction should be higher than the pK_a value, which is 5.8 for collagen. This is because the carboxylate anions otherwise exhibit a higher coupling rate than that exhibited by the carboxyl groups.^[6] The coupling reaction using EDC is one of the most widely used crosslinking methods in the biomaterials field; 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 rather rapidly under aqueous conditions.^[3–7] 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 crosslinkers such as diol-related crosslinkers 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 crosslinking was brought up.

Our research group attempted to control the coupling reaction of EDC/NHS using the collagen gel. We found out that in order to obtain a crosslinked collagen gel that is

mechanically tough and possesses a low swelling ratio, collagen should be crosslinked under neutral or alkaline pH conditions with the EDC/NHS/carboxylate anions in a ratio of 10:10:1.^[4] The swelling ratio in pH 7.4 was less than 150%, which is approximately 1/5 of that of the uncrosslinked collagen gel. It was shown that no denaturation of the triple helix had occurred. The elastic modulus increased to approximately 4.8 times that of the uncrosslinked collagen gel. However, when we investigated the free amine group contents, the lowest value of that we could obtain was approximately 60%. Glutaraldehyde crosslinking on the same collagen gel revealed that the free amine group content was less than 15% and the diol-related crosslinker exhibited an approximate free amine group content of 30%.^[7] We concluded that this is the lowest possible coupling reaction rate for the collagen microfibrils under aqueous conditions. Thereafter, we started to search for new conditions for collagen crosslinking using EDC and NHS. In this study, we attempted to control the EDC/NHS coupling reaction rate by making the reaction environment highly hydrophobic. To achieve the more 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. There are a number of research papers on the reaction of EDC/NHS with collagen in ethanol, but it is not completely clear as to how the EDC and NHS coupling reaction would be affected when the alcohol percentage in aqueous conditions changes; hence, different ethanol concentrations are being used without characterization of the coupling rate.^[8–11]

Experimental Part

Preparation of Collagen Gel

The preparation of the collagen film was performed by the same method as that reported previously.^[5,7] A 0.5 wt.-% solution of collagen type I (I-AC, KOKEN, Tokyo, Japan) was concentrated into a 2 wt.-% collagen type I solution and used for the film preparation. The collagen solution was dropped onto a 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.

To investigate the effect of the solvent, the collagen film was immersed into an ethanol/water mixed solvent containing EDC and NHS (both from Kanto Chemicals, Tokyo, Japan). Each chemical was added in the mole ratio of EDC/NHS/collagen-carboxylic acid group = 10:10:1. The ethanol mole concentration (N_A) was changed from 0 to 1 [ethanol/water ratio from 10:0 to 0:10 (v/v)]. The crosslinking procedure was allowed to continue for 24 h at 4 °C to produce a crosslinked gel (EN gel). After 24 h, the reaction was terminated by removing the gel from the solution. The gel was then washed with distilled water for 3 d in order to remove any unreacted chemicals from the collagen gel. For the

re-crosslinking process, the same procedure as above was repeated using water, $N_A \approx 0.12$, $N_A \approx 0.42$ and 100% ethanol as the reaction solvent. Crosslinking of the collagen gel to glutaraldehyde was performed by using a 0.5 wt.-% glutaraldehyde solution (Merck, Darmstadt, Germany) in a phosphate buffer solution (PBS).^[12] The collagen film was immersed in the glutaraldehyde/PBS solution and was crosslinked for 3 h at room temperature. After crosslinking, the sample was first rinsed under running tap water for 30 min and then in 4 M NaCl for 2 h. In order to eliminate NaCl, the sample was rinsed with distilled water for 1 d to yield a glutaraldehyde-crosslinked collagen gel. The 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE)-crosslinked collagen was prepared by immersing a collagen film in a 4% BDDGE/PBS solution and reacting for 5 d.^[13] The BDDGE-crosslinked collagen was left under running tap water for 15 min to wash off the unreacted BDDGE. The washing process was repeated several times. The glutaraldehyde-crosslinked collagen gel and the BDDGE-crosslinked collagen gel were used for the characterization of the free amine group content.

Characterization of the Collagen Gel

A solubility test was performed in the ethanol/water mixed solvents. The collagen films (3–4 mg) and collagen chunks obtained from lyophilization (7–10 mg) 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 1×10^{-7} 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 a 2-(*N*-morpholino)ethansulfonate (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, 1 440, and 4 320 min (3 d) and the adsorbed amounts of the solvent were measured. The following equation was used for the calculation of D :

$$M_t/M_\infty = 4(Dt/\pi l^2)^{1/2}, \quad (1)$$

where M_t and M_∞ are the amounts of the solvent adsorbed at time t and at infinity, respectively and l is the thickness of the collagen gel.^[14,15]

The primary amine group concentrations in the tissue samples were determined using a colorimetric assay.^[16,17] From each sample a 2–4 mg specimen was prepared. These samples were immersed in a 4 wt.-% aqueous NaHCO_3 solution (Kanto Chemicals, Tokyo, Japan) and a 0.5 wt.-% aqueous solution of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS; Wako chemicals, Osaka, Japan) was added. The reaction was allowed to continue 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 concentration of the reacted amine groups was calculated using the following equation:^[16,17]

$$[\text{NH}_2] = (A \cdot V)/(\epsilon \cdot l \cdot m) \quad (2)$$

where $[\text{NH}_2]$ denotes the reacted amine group content [in mol/g of collagen gel]; ϵ , the molar absorption coefficient of trinitrophenyl lysine ($1.46 \times 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); A , the absorbance; V , the volume of the solution [mL]; l , the path length [cm]; and m , the weight of the sample [mg]. The free amine group contents were calculated by assuming that the uncrosslinked collagen gel has 100% free amine groups.^[7,8] The experiment was repeated five times and the average along with the standard deviation was calculated.

All the experiments were repeated at least thrice and the values were expressed as mean \pm standard deviation. In several figures, the error bars are not visible because they are included in the plot. A statistical analysis was performed using the student's *t* test with the significance level set at $p < 0.05$.

Results and Discussion

We started by setting up three hypotheses: 1) ethanol does not denature the triple helix, 2) ethanol prevents the hydrolysis of EDC, and 3) the carboxyl groups are reactive with EDC in ethanol. These three hypotheses are important in the aspect that the failure of one hypothesis implies that the collagen crosslinking is meaningless. Hence, the experiment was conducted by proving the hypotheses one by one. We first started with the characterization of 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 collagen microfibrils. Using a CD spectrometer, we observed the conformation structure of collagen in the range of $N_A \approx 0$ –0.42 (ethanol/water = 0/10–7/3, v/v). The increase in ethanol concentration against water did not bring about any distinguishable change in the triple helical structure (Figure 1). The positive band and the cross-band seen in the CD spectra were the same for all the tested samples ($N_A \approx 0$ –0.42). The negative band exhibited a slight red-shift as the ethanol concentration was increased. However, no signs of denaturation, such as a decrease in the peak intensity of positive and negative band, were detected.^[18,19] Hence, it is assumed that ethanol up to $N_A \approx 0.42$ does not change the triple helices into random coils.^[20] 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.^[20] The structure of collagen depends on the concentration of the alcohols. This

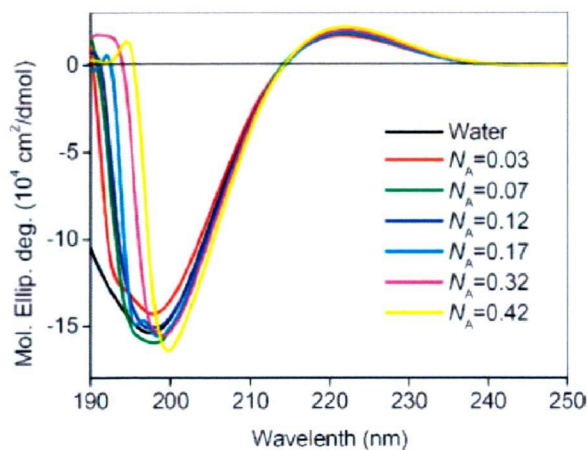


Figure 1. CD spectra of the collagen microfibrils under various ethanol mole concentrations.

is because an increase in the hydrophobic interactions between the solvent and collagen stabilized the structure of collagen.^[21] The hydrophobic interactions between the non-polar amino acid side chains are also very important factors that contribute to the stabilization of the helices. 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.^[22] However, it is generally assumed that this tendency is strongly influenced by the type of alcohol used. Thus, polyhydric alcohols such as sorbitol or glycerol favour the native structure, while monohydric alcohols enhance the native structure.^[23] In the case of ethanol, the secondary and tertiary structures of collagen would be affected.^[22,24] As result, it is assumed

that the transformation 'triple helix → random coil' does not occur, and the use of ethanol for the amide coupling reaction for collagen crosslinking is preferable. The triple-helix structure at $N_A > 0.55$ was measured indirectly. That is, since the random coil is not reconverted to the triple-helix structure,^[22] we resolubilized collagen in water and observed the CD spectra and concluded that the collagen structure would remain a triple helix even at extremely high ethanol mole concentrations.

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 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 un-crosslinked, 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. Figure 2 shows the morphology of collagen microfibrils observed by SEM. It is seen that the microfibril structures disappear as the hydrophobicity increases. The disappearance of the fibrillar structure decreases the absorptivity of the solvent. 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 crosslinked with EDC/NHS in a MES buffer that was prepared by the method reported previously.^[5] This shows that the D of the solvent decreases rapidly when $N_A \geq 0.55$ (ethanol/water = 8/2,

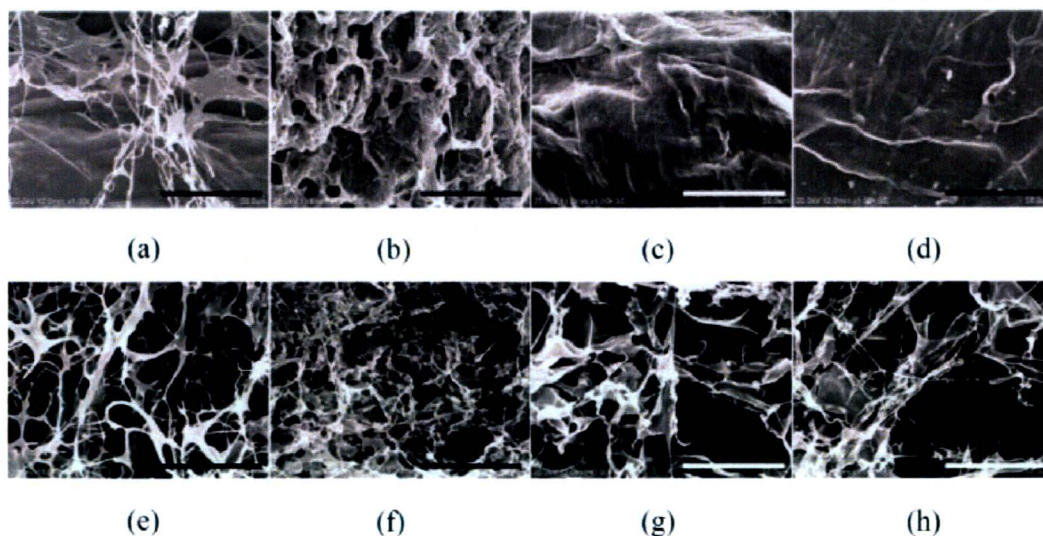


Figure 2. Morphology of collagens after immersing in ethanol/water mixed solvents of different concentrations. (a) Water, (b) $N_A \approx 0.07$, (c) $N_A \approx 0.17$, (d) $N_A \approx 0.32$, (e) $N_A \approx 0.42$, (f) $N_A \approx 0.55$, (g) $N_A \approx 0.73$, and (h) ethanol. Single bar indicates 50 μm .

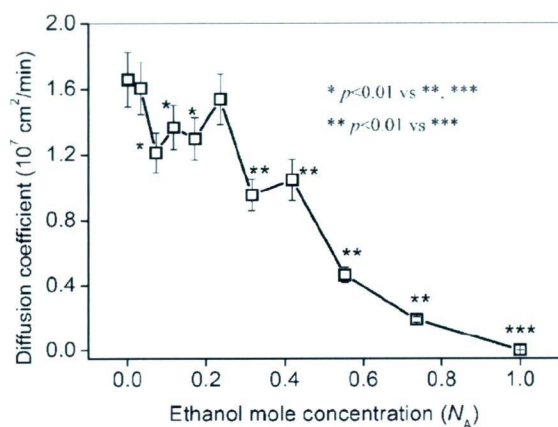


Figure 3. Change in the diffusion coefficient of ethanol in collagen gel according to ethanol mole concentrations.

v/v); furthermore, the D value of pure ethanol ($1.2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$) is approximately 1400 times lower than that of pure water. This directly affects the crosslinking 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 crosslinking procedure.

Using EDC and NHS, we obtained crosslinked collagen gels under various ethanol concentrations (Figure 4). When EDC and NHS are used for the crosslinking process, the lowest value of the free amine group content was approximately 45% (60% when crosslinked in MES buffer). This can be achieved when the crosslinking was executed for 24 h at $N_A \approx 0.07$ – 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

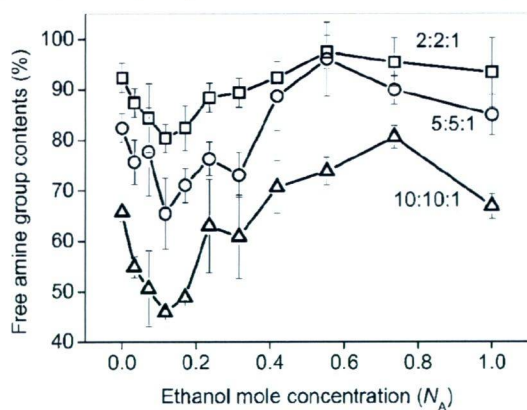


Figure 4. Change in the free amine group contents of collagen gel according to ethanol mole concentrations.

$N_A \approx 0.24$ (ethanol/water = 5/5, v/v), the free amine group content increases again, and from $N_A \approx 0.42$ and above, 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.^[25,26] The reactivity of the carboxyl groups decreases as the ethanol concentration increases because EDC reacts with the carboxylate anions. The increase in the number of neutral carboxyl groups would lead to relatively low *O*-isoacylurea formation.^[6] Furthermore, when $N_A \geq 0.42$, the crosslinking is assumed to be mainly concentrated on the surface of the collagen gel. The decrease in D causes heterogeneous coupling reactions in the collagen gel. That is, the partly crosslinked 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. The sudden change in the environment causes the gel to adsorb a large amount of water, which makes the uncrosslinked 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 crosslinked 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 D 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 uncrosslinked collagen microfibrils. This implies that the crosslinking of the collagen gel would start from the surface and then occur inside the collagen gel. Furthermore, it is possible to crosslink only the surface of the collagen gel to obtain a phase-separated collagen gel when the ethanol concentration is controlled.

An extended reaction time under high-hydrophobic conditions ($N_A \geq 0.42$) did not cause any significant difference in the free amine group content. The crosslinking rate is much higher after 24 h, as compared to 4 h; however, no significant change is observed after 48 h. When crosslinking was performed in MES buffer, we observed a decrease in the free amine group content;^[7] however, in the case of ethanol, the formation of the *O*-isoacylurea does not occur due to the slow adsorption and protonation of the carboxyl groups.

Is it possible to obtain a collagen gel with a smaller number of free amine groups? To answer this question, we have re-crosslinked the collagen gel by repeating the same procedure (Figure 5). The activation by EDC can be triggered when EDC is introduced into the reaction solvent.^[4] We

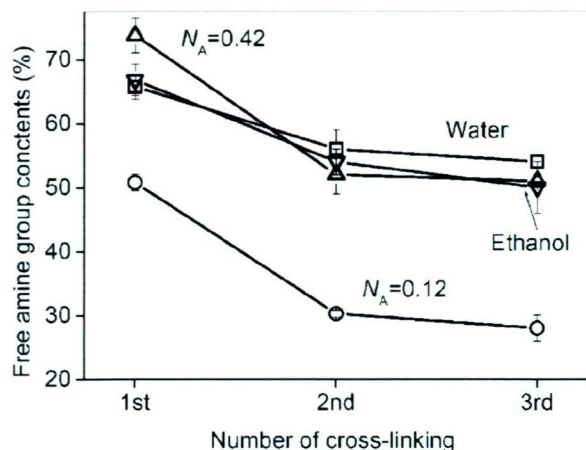


Figure 5. Change in the free amine group content of collagen gel by the re-crosslinking procedure in different solvents.

have proved in our previous report that the carboxyl groups can be activated at any point of time during the course of the reaction.^[6,7] Thus, by re-crosslinking the collagen gel, we attempted to evaluate the highest coupling rate possible using this process. The re-crosslinking was possible and the least value of the free amine group content was 30% ($N_A \approx 0.12$). This value is still high as compared with the glutaraldehyde-crosslinked collagen gel ($\approx 12\%$ using the same collagen gel) and the BDDGE-crosslinked collagen ($\approx 25\%$ using the same collagen gel). This is thought to be the lowest limit of the EDC/NHS crosslinker. Unlike glutaraldehyde and BDDGE, which can interconnect the microfibrils of the collagen, EDC/NHS can only induce intra- and interhelical crosslinks. It is difficult to assume that the microfibrils are crosslinked via the EDC/NHS crosslinker due to distal problem. Hence, it is not possible to achieve a free amine group content that is lower than $\approx 30\%$. The crosslinking may still occur when a different crosslinker or a polymer is added to this collagen gel.

Conclusion

We have proposed a new method for controlling the coupling reaction rate using EDC and NHS for collagen crosslinking. 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. The highest reaction rate was achieved at $N_A \approx 0.07$ – 0.17 with 51 mmol of EDC in 24 h. This is the optimum concentration range that balances the reactivity of EDC and the formation of carboxyl groups. 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 $N_A > 0.55$; 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.

Received: July 17, 2007; Accepted: September 21, 2007; DOI: 10.1002/mabi.200700206

Keywords: collagen gel; crosslinking; EDC; ethanol

- [1] C. B. Weinberg, E. A. Bell, *Science* **1986**, *231*, 397.
- [2] E. Khol, *Biomaterials* **1997**, *18*, 95.
- [3] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827.
- [4] 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.
- [5] K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1.
- [6] N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 123.
- [7] K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3153.
- [8] J. S. Pieper, T. Hafmans, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials* **2000**, *21*, 581.
- [9] H. M. Powell, S. T. Boyce, *Biomaterials* **2006**, *34*, 5821.
- [10] L. Buttafoco, P. Engbers-Buijtenhuijs, A. A. Poot, P. J. Dijkstra, I. Vermes, J. Feijen, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2380.
- [11] S. N. Park, J.-C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, H. Suh, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1205.
- [12] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 139.
- [13] R. Zeeman, P. J. Dijkstra, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, M. Hendriks, P. T. Cahalan, J. Feijen, *Biomaterials* **1999**, *20*, 921.
- [14] C. S. Brazel, N. A. Peppas, *Polymer* **1999**, *40*, 3383.
- [15] K. Nam, J. Watanabe, K. Ishihara, *Int. J. Pharm.* **2004**, *275*, 259.
- [16] W. A. Bubnis, C. M. Ofner, III, *Anal. Biochem.* **1992**, *207*, 129.
- [17] F. Everaerts, M. Torrianni, M. van Luyn, P. van Wachem, J. Feijen, M. Hendriks, *Biomaterials* **2004**, *25*, 5523.
- [18] Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *Biopolymers* **1996**, *39*, 859.
- [19] Y. Imanishi, N. Kawazoe, K. Ichizawa, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Phys.* **2003**, *41*, 3632.
- [20] J. Schnell, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *127*, 496.
- [21] E. Bianchi, A. Rampone, A. Ciferri, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3341.
- [22] A. E. Russel, D. R. Cooper, *Biochemistry* **1969**, *8*, 3980.
- [23] R. Usha, R. Maheshwari, A. Dhathathreyan, T. Ramasami, *Colloids Surf., B* **2006**, *48*, 101.
- [24] R. Usha, S. Sundar Raman, V. Subramanian, T. Ramasami, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *430*, 101.
- [25] K. Sarmini, E. Kennndler, *J. Chromatogr. A* **1998**, *811*, 201.
- [26] A. Doğan, E. Kılç, *Anal. Biochem.* **2007**, *365*, 7.

トピックス

脱細胞化角膜の特性とin vivo生体適合性評価

Characteristics and in vivo biocompatibility of the decellularized cornea by ultra-high pressurization

木村 剛, 船本 誠一, 橋本 良秀,
 佐々木 秀次, 望月 學, 岸田 晶夫, 小林 尚俊

Tsuyoshi KIMURA, Seiichi FUNAMOTO, Yoshihide HASHIMOTO,
 Syuji SASAKI, Manabu MOCHIZUKI, Akio KISHIDA, Hisatoshi KOBAYASHI

Abstract

We investigated the characteristics of a decellularized porcine cornea by ultra-high hydrostatical pressurization (UHP) method. The UHP method consists of the disruption of cells by hydrostatical pressurization and the removal of components of the disrupted cells by washing process. Porcine cornea were hydrostatically pressed at 10,000 atmospheres and 30 °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.

1. はじめに

角膜白斑, 角膜変性や水疱性角膜症などの角膜混濁や高度の角膜乱視を, ヒトより採取した正常な角膜で置換する「角膜移植」術が行われている。日本国内では年間2万人以上の患者が待機しているが, 角膜移植が行われるのは年間1600人程度である。世界的には, 角膜の障害による失明は少なくとも10万人以上存在すると推定されている。また, 現在の角膜移植医療では, 他人の角膜を移植する同種移植であるため, 原疾患による拒絶反応が課題となる。このような状況を打開するために, 人工角膜あるいは角膜再生医療技術の開発が強く望まれている。移植用角膜の代替材料の研究として, 透明な高分子系材料を用いた人工角膜の研究が行われており, ポリメチルメタクリレート (PMMA), ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) やポリビニルアルコール (PVA) など

が試みられている^{1,4)}。しかし, 現状では, 移植に応用可能な人工角膜は未だ開発されておらず, 人工角膜と生体角膜の適合性が不十分であることから, レシピエント細胞の基材上へのマイグレートが十分でなく, 人工角膜との接合部での融解に伴う脱落や感染症などが重要課題となっている。一因としては, 生体角膜と人工角膜との物性の相違が挙げられる。一方, 最近では, 再生医療の側面からの研究が行われている。再生医療技術によって, 角膜上皮および角膜内皮が臨床応用されており, 再生医療技術の角膜再生への有効性が示され, 角膜全層の再生が期待されている。角膜上皮および角膜内皮の再生は, 細胞のみを用いた細胞シートや羊膜を用いた基本的には細胞層のみの再生であり, 角膜のほぼ90%を占める実質部分の再生に関しては, 未だ臨床応用にいたる再生技術は開発されていない。この角膜実質部の再生については, コラーゲンゲル・スポンジを用いた研究が大部分であり, 組織構造, 強度などの物性は生体組織に類似しない。そこで我々は, 生体組織の物性に類似する人工角膜として, 脱細胞化角膜の調製について検討している。脱細胞化組織とは, 異種組織から細胞を除去し, 残存する生体

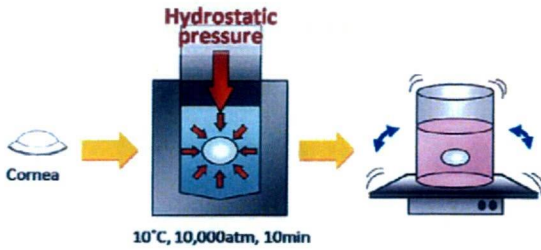


図1 超高压脱細胞化法

支持組織を指す。脱細胞化組織の調製法としては、界面活性剤やタンパク質分解酵素などの薬液による化学的手法と、最近我々が開発した物理的手法である超高压処理法がある。後者は、超高压印加により細胞を破壊し、細胞残渣を洗浄により除去する手法である（図1）。これまで、血管、心臓弁、靭帯、骨などの種々の組織における脱細胞化に成功している^{5,6}。昨年まで、脱細胞化角膜を界面活性剤法、超高压処理法による角膜の脱細胞化と得られた脱細胞化角膜の物性について検討した。本研究では、超高压脱細胞化角膜の特性を詳細に検討し、in vivoでの異種移植実験を行い、人工角膜としての有効性について検討した。

2. 超高压処理法を用いた脱細胞化角膜の特性

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超高压処理法を用いて角膜の脱細胞化を行った。具体的には、10°C、10000気圧、10分間の超静水圧を施圧した後、細胞培養液中での72時間の浸透洗浄により行った。得られた脱細胞化角膜の細胞除去を確認するため、組織切片のヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色による組織学的観察およびDNA残存量を検討した。H-E染色組織所見では、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残存量の定量では検出限界程度のDNAが定量され、破壊された細胞の残渣がほとんど除去された。これらの結果より、ほぼ完全な脱細胞化が達成されたと考えられる。また、角膜組織はコラーゲンおよびグリコサミノグリカン（GAG）を主成分とし、角膜特有のゲル様物性はGAGに寄るところが大きいことから、GAGの残存は特性維持の点において重要である。一部の界面活性剤を用いた脱細胞化においては、GAGの溶解も報告されている⁷。GAG残存量を定量した結果、超高压脱細胞化処理後においても、未処理角膜と同程度のGAG量が示された。さらに、圧縮試験にて脱細胞化角膜の力学特性を検討した結果、脱細胞化直後では若干の弾性率の低下が示されたが未処理角膜とほぼ同等であった。生体の角膜では、角膜内皮細胞のポンプ機能により約70%の膨潤度に調節されていることが知られている。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、その後の弾性率を測定した。脱細胞化角膜の弾

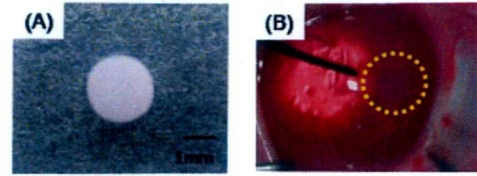


図2 (A)ブタ脱細胞化角膜、(B)ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植

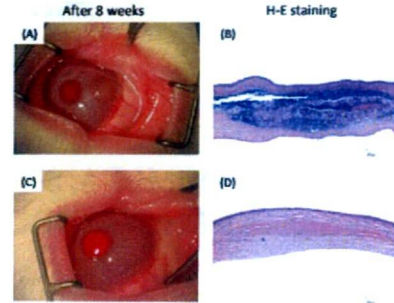


図3 ブタ脱細胞化角膜のウサギへの移植結果（8週間後）。(A,B)未処理ブタ角膜、(C,D)超高压脱細胞化角膜

性率は、未処理角膜の約1.3倍に上昇し、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。

3. 脱細胞化角膜のin vivo評価

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4 mm辺のポケットを作製し、直径約2 mm×厚み0.16 mmの脱細胞化角膜を挿入した（図2）。比較対象としては、未処理のブタ角膜を用いた。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。以上の結果から、超高压脱細胞化角膜の人工角膜としての応用可能性が示された。

4. まとめ

生体組織から細胞を除去した脱細胞化角膜を超高压処理法により調製し、物性および生体適合性について検討した。完全な細胞除去と生体角膜に類似する力学特性を有する脱細胞化角膜が得られた。また、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。以上の結果から, 生体由来人工角膜としての応用が期待できる。

参考文献

- 1) 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(24): 3311-3317
- 2) Duan D, Klenkler BJ, Sheardown H, Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue-engineered corneas, *Exp Rev Med Devices*, 2006; 3(1): 59-72
- 3) Kobayashi H, Kato M, Taguchi T, Ikomo T, Miyashita H, Shimmura S, Tsubota K Tanaka J, Collagen immobilized PVA hydrogel-hydroxyapatite composites prepared by kneading methods as a material for peripheral cuff of artificial cornea, *Mater Sci & Eng C*, 2004; 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, Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium, *J Biomed Mater Res Pt B Appl Biomater*, 2006; 76B(1): 56-63
- 5) 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.
- 6) Fujisato T, Yin M, Minatoya K, Niwaya K, Kishida A, Nakatani T, Kitamura S, Host cell infiltration to transplanted acellular allografts in porcine model, *Tissue Eng*, 2006; 12(4): 1077-1077
- 7) Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods, *Eur J Cardio-Thor Sug*, 2005; 27(4): 566-571

Pressure-Induced Molecular Assembly of Hydrogen-Bonded Polymers

SHINGO MUTSUO,¹ KAZUYA YAMAMOTO,² TSUTOMU FURUZONO,³ TSUYOSHI KIMURA,⁴ TSUTOMU ONO,¹ AKIO KISHIDA⁴

¹Department of Material and Energy Science, Graduate School of Environmental Science, Okayama University, Tsushima-Naka, Okayama 700-8530, Japan

²Department of Nanostructured and Advanced Materials, Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

³Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishiro-Dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

⁴Department of Applied Functional Molecules, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda-Surugadai, Chiyoda-Ku, Tokyo 101-0062, Japan

Received 10 August 2007; accepted 21 December 2007

DOI: 10.1002/polb.21407

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

ABSTRACT: Controlling the noncovalent bondings such as electrostatic interaction, van der Waals force and hydrogen bond, is the key factor to generate molecular assembly. We show that pressure is one of the most intensive variables for controlling these intermolecular forces and producing assembled structure. Macro-gel and nanoparticles of hydrogen-bonded polymers were simply obtained through an ultrahigh-pressure process. The morphology of the obtained assembly depends on concentration and various conditions of the pressurization. These results indicate that the ultrahigh-pressure induces inter/intra-hydrogen bond, which is strong enough to maintain microassemblies such as gels and particles. This methodology leads to the molecular design of pressure-induced molecular assembly, and nonharmful processes for molecular separation and drug development. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *J Polym Sci Part B: Polym Phys* 46: 743–750, 2008

Keywords: crosslinking; hydrogels; nanoparticles; water-soluble polymers

INTRODUCTION

Molecular assembly technology has been gathering interest in the material processing field, especially nanotechnology. Molecular assembly is achieved by noncovalent bonding between adjacent molecules. The development of carbon nanotubes as circuit wires^{1,2} and the incorpora-

tion of anticancer drugs and amphiphilic polymers into nanomicelles^{3,4} are examples of molecular assembly in which noncovalent bonding, such as electrostatic interaction, van der Waals interactions and hydrogen bonds, are well combined.^{5–8} Controlling these intermolecular forces is the key factor to create or collapse the assembled structure. Supramolecular chemistry has expanded to allow various elemental molecules to generate elegant assemblies,^{9–12} whereas the operative factors which regulate molecular assembly are mostly limited by the concentration and/or temperature. Here, we show that

Correspondence to: A. Kishida (E-mail: kishida.fm@tmd.ac.jp)

Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics, Vol. 46, 743–750 (2008)
© 2008 Wiley Periodicals, Inc.